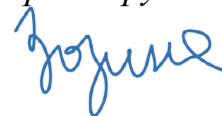


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук
Кондратенко Светлана Николаевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
Кукес Владимир Григорьевич

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Роль коэнзима Q10 в организме	14
1.2. Биосинтез и метаболизм коэнзима Q10	18
1.3. Редокс-статус.....	20
1.4. Физико-химические свойства коэнзима Q10.....	25
1.5. Методы определения CoQ10 в плазме крови.....	27
1.5.1. ВЭЖХ с электрохимическим детектированием	28
1.5.2. ВЭЖХ со спектрофотометрическим (УФ) детектированием	29
1.5.3. ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием.....	31
1.5.4. ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектированием.....	32
1.5.5. ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.....	33
1.5.6. Стабильность биопроб коэнзима Q10	35
1.5.7. Пробоподготовка и экстракция коэнзима Q10	38
1.6. Роль коэнзима Q10 в некоторых патологиях.....	42
1.6.1. Влияние концентрации CoQ10 в плазме крови на развитие патологий сердечно-сосудистой системы.....	43
1.6.2. Роль коэнзима Q10 в развитии других заболеваний	45
1.7. Влияние некоторых ЛС на уровень эндогенного коэнзима Q10	48
1.8. Кудесан®	51
1.9. Выводы по главе.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, исследуемые объекты....	55
2.2. Реактивы и приготовление растворов	56
2.2.1. Реактивы и приготовление растворов для методики ВЭЖХ-УФ	56
2.2.2. Реактивы и приготовление растворов для методики ВЭЖХ-МС/МС.....	56
2.3. Приготовление модельных смесей.....	57
2.3.1. Приготовление модельных смесей стандартных разведений убихинона (CoQ10) для методики ВЭЖХ-УФ	57

2.3.2. Приготовление модельных смесей стандартных разведений убихинона и убихинола (CoQ10 и CoQ10H ₂) для методики ВЭЖХ-МС/МС	57
2.4. Дизайн исследования содержания убихинона и убихинола в плазме крови пациентов.....	58
2.5. Статистическая обработка полученных результатов	69
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УБИХИНОНА И УБИХИНОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ	71
3.1. Разработка методики количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ	71
3.2. Разработка методики количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС	83
3.2.1. Количественное определение убихинона в плазме крови	97
3.2.2. Количественное определение общего CoQ10 в плазме крови.....	101
3.2.3. Количественное определение убихинола в плазме крови.....	108
3.3. Выводы по главе.....	112
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СОДЕРЖАНИЯ УБИХИНОЛА, УБИХИНОНА, ОБЩЕГО COQ10 И ЕГО РЕДОКС-СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ (II-III ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КЛАСС ПО NYHA)	115
4.1. Определение эндогенного уровня общего CoQ10 в плазме крови практически здоровых лиц	115
4.2. Определение эндогенных плазменных уровней убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и II-III ФК ХСН	116
4.3. Влияние некоторых лекарственных средств на эндогенный уровень убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и II-III ФК ХСН	121
4.4. Выводы по главе.....	135

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ КУДЕСАНА® НА ПЛАЗМЕННЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УБИХИНОНА, УБИХИНОЛА, ОБЩЕГО COQ10 И ЕГО РЕДОКС-СТАТУС У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ (0-I ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КЛАСС ПО NYHA).....	137
5.1. Содержание убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и 0-I ФК ХСН на фоне стандартной терапии	137
5.2. Особенности содержания убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и 0-I ФК ХСН, получавших в составе стандартной терапии Кудесан®	143
5.3. Выводы по главе.....	151
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	153
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	166
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	168
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	168
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	169
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	171

ВВЕДЕНИЕ

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 [1-5]. В организме CoQ10 существует в двух формах: окисленная (убихинон) и восстановленная (убихинол), обладающая непосредственной активностью против окислителей [6, 7]. Отношение концентраций убихинол/убихинон, определяемое как редокс-статус коэнзима Q10, рассматривается как один из важных показателей состояния антиоксидантной системы организма [8].

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 [9] до 1,65 мкг/мл [10], и зависит от различных факторов [11, 12]. Считается, что у человека плазменный пул CoQ10 представлен более чем на 90% его восстановленной формой – убихинолом [13], а среднее значение редокс-статуса CoQ10 у здоровых лиц составляет 95/5 [14].

CoQ10 является перспективным кардиопротектором, поддержание его постоянного уровня в организме является необходимым [15, 16]. 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) [17] и повышением плазменной концентрации общего CoQ10 [18, 19]. 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

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 [20], либо при одновременном определении убихинона и убихинола пренебрегают добавлением стабилизатора для предотвращения окисления убихинола [21, 22], 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 этоксида 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 Са 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. Работа изложена на 191 странице машинописного текста, содержит 46 таблиц и 40 рисунков. Список литературы включает 198 источников, из них 163 работы зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль коэнзима Q10 в организме

В связи с неблагоприятными факторами окружающей среды: химическими, физическими, биологическими - обостряются процессы свободнорадикального окисления. Антиоксидантная система организма включает в себя биохимические механизмы адаптации, которые улучшают сопротивляемость организма в борьбе со свободными радикалами и продуктами окисления. Однако, из-за неспособности антиоксидантной системы адаптироваться к негативным внешним воздействиям растет частота заболеваний диабетом, раком и аллергиями [23, 24].

Постоянная координация функций и систем, необходимых для защиты организма, выполняется биорегуляторами. Биорегуляторы – это эндогенные вещества, которые модифицируют скорость или интенсивность биологических процессов для поддержания гомеостаза, или удовлетворения изменяющихся потребностей организма. Очень важную роль среди биорегуляторов занимают антиоксиданты, которые повышают защитные функции организма [25].

Антиоксиданты представляют собой широкий класс соединений, контролирующих уровень свободных радикалов и препятствующий их накоплению [26]. С химической точки зрения антиоксидант представляет собой соединение с прочно спаренным электроном, который он отдает свободному радикалу, таким образом, нейтрализуя его. По типу цепной реакции, поделившись своим электроном, антиоксидант и сам временно может превратиться в свободный радикал, пока не захватит электрон другого антиоксиданта, например, из каскада электронов дыхательной цепи митохондрий [27]. Центральную роль в антиоксидантной системе организма играет коэнзим Q10.

В 1957 году коэнзим Q10 был получен из бычьего сердца американским ученым Фредериком Крейном в Институте Ферментов штата Висконсин [28]. Позже было установлено, что CoQ10 является частью дыхательной цепи переноса электронов в митохондриях. В 1958 году Фолкер (Merck, Sharp, Dohme)

идентифицировал его химическую структуру и функции. Впервые убихинон был применен у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) [29].

Коэнзим Q10 обладает множеством важных функций в организме человека. В первую очередь, он является ключевым компонентом цепи переноса электронов в митохондриях [30]. Однако, долгое время его значимость нивелировалась по следующим причинам: во-первых, требовалось большое количество экзогенного убихинона для восстановления клеточного дыхания в препаратах. Во-вторых, немаловажную роль играло его медленное превращение из окисленной формы в восстановленную, другими словами, он обладал низким редокс-статусом по сравнению с другими элементами дыхательной цепи. Позже было установлено, что в митохондриях коэнзим Q10 находится гораздо в большем количестве, чем остальные переносчики электронов [31].

Благодаря своей липофильности, он взаимодействует с дегидрогеназами дыхательной цепи и переносит 2 электрона к цитохромам, таким образом, играя важную роль в синтезе аденозинтрифосфата (АТФ) [10, 32-34]. Основная часть синтеза АТФ происходит на внутренней мембране митохондрий, где и был обнаружен коэнзим Q10. Уникальная функция коэнзима Q10 заключается в том, что он переносит электроны от первичных субстратов к системе оксидаз и одновременно, выталкивает протоны наружу митохондриальной мембраны. Этот перенос приводит к образованию градиента протонов в мембране. По мере возвращения протонов внутрь мембраны происходит образование АТФ. CoQ10 окисляется и осуществляет выброс протонов наружу мембраны, одновременно захватывая электроны и протоны на внутренней стороне митохондриальной мембраны [35].

Кроме того, CoQ10 участвует в реакциях окислительного фосфорилирования [133]. В дополнение к своей роли переносчика электронов, CoQ10 может также действовать как антиоксидант, защищающий плазматическую мембрану от перекисного окисления (ПОЛ) [3-5, 36-38]. Интересно отметить обратную корреляцию между концентрациями CoQ10 в плазме и скоростью ПОЛ [39], что

указывает на то, что CoQ10 может быть одним из основных веществ, определяющих устойчивость плазматических мембран к ПОЛ. Исследования *in vitro* показали, что коэнзим Q10 ингибирует липопротеины низкой плотности намного сильнее по сравнению с другими антиоксидантами: бета-каротеном или альфа-токоферолом [40]. Количество CoQ10 во многих мембранах превышает таковое у витамина E в 3-30 раз [41]. В организме человека коэнзим Q10 предотвращает окисление белков, ДНК и липидов [42, 43]. Кроме того, CoQ-зависимые плазматические оксидоредуктазы могут иметь важное значение для регенерации восстановленных форм других антиоксидантов, что способствует повышению общей антиоксидантной защиты [44]. Например, CoQ10 участвует в прямом восстановлении токоферил-радикала, образованного реакцией токоферола с липидным или кислородным радикалом [1]. За регенерацией токоферола также можно наблюдать в ЛПНП, где небольшие количества CoQ10 защищают запасы токоферола от окисления [45, 46].

Уникальность CoQ10 заключается в способности к регенерации *in vivo* из восстановленной формы в окисленную и обратно [7, 47].

Антиоксидантное действие коэнзима Q10 обусловлено, главным образом, его восстановленной формой: убихинолом (CoQ10H₂). Активность восстановленной формы кофермента Q на три порядка выше невосстановленной [48]. Это объясняет тот факт, что большая часть коэнзима Q10 в клеточных мембранах находится в форме убихинола [49]. Также, важно отметить существование в мембранах ферментов, которые способны восстанавливать любой радикал коэнзима Q10, образовавшийся в результате реакции убихинона с липидными или кислородными радикалами. Известно, по крайней мере, три фермента, способных возвращать коэнзиму Q10 его восстановленную форму в эндомембранах: НАДН цитохром b₅ редуктаза, НАДН/НАДФН оксидоредуктаза и НАДФН коэнзим Q редуктаза [50, 5].

В организме CoQ10 обнаруживается во всех органах (Таблица 1). Самое высокое содержание убихинона наблюдается в тканях сердца, почек, печени и мышц. В свою очередь, в клетках - в везикулах аппарата Гольджи,

митохондриальных плазматических мембранах, лизосомах.

Таблица 1 - Распределение CoQ10 в тканях организма человека

Ткани	CoQ10 (нмоль/г)
Сердце	132,0
Почки	77,0
Печень	63,6
Мышцы	46,0
Мозг	15,5
Кишечник	13,3
Лёгкие	9,2
Плазма (μмоль/л)	1,1

Источник: Miles M.V. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults/ M.V. Miles, P.S. Horn, J.A. Morrison// Clin Chim Acta. 2003.- Vol.332.- №1-2.- p. 123-132 [14];

Белая О.Л. Опыт применения коэнзима Q10 в комплексной терапии ишемической болезни сердца с дислипидемией/ О.Л. Белая// . Клиническая медицина. – 2006.- №5. – с.59-62 [51].

Данные о содержании коэнзима Q10 в крови здоровых добровольцев представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Концентрация CoQ10 в плазме крови здоровых добровольцев

Группа здоровых добровольцев	Концентрация, мкг/мл			Убихинол: Убихинон	Автор
	Общий CoQ10	Убихинон	Убихинол		
Женщины 42,6±9,7 года	1,02 ± 0,31	0,03±0,01	0,98±0,31	96,07:3,93	[14]
Мужчины 41,4±9,4 года	1,20 ± 0,37	0,05±0,01	1,16±0,16	95:84:4,16	
Общее	1,10 ± 0,35	0,05 ± 0,01	1,07 ± 0,34	95,5:4,5	
Мужчины и Женщины 40 лет	1,02±0,30	0,10*	0,92*	89,8:10,2	[52]

Продолжение Таблицы 2

Мужчины и Женщины Средний возраст 40 лет	1,02±0,30	0,10*	0,92*	89,8:10,2	[52]
Мужчины 40±7 лет	1.964±1.34	0,35*	1,61*	82,0:18,0	[53]
Общее	0,759 ± 0,268	0,096*	0,663*	87,3:12,7	[54]
Мужчины 18-40лет	0,796 ± 0,293	0,099*	0,697*	87,6:12,4	
Женщины 18-40лет	0,734 ± 0,248	0,095*	0,639*	87,1:12,9	
Общее	0,885 ± 0,302	0,117*	0,772*	87,2:12,8	
Мужчины 41-60 лет	0,939 ± 0,335	0,117*	0,822*	87,5:12,5	
Женщины 41-60 лет	0,839 ± 0,265	0,109*	0,730*	87,0:13,0	
Общее	0,830 ± 0,235	0,114*	0,716*	86,3:13,7	
Мужчины 61-82 лет	0,835 ± 0,235	0,114*	0,721*	86,3:13,7	
Женщины 61-82 лет	0,827 ± 0,236	0,112*	0,715*	86,4:13,6	
-	0,968 ± 0,218	0,041 ± 0,012	0,927 ± 0,214	95,6:4,4 (В среднем 95:5)	[55]

Примечание: *- Рассчитано автором на основе литературных данных

1.2. Биосинтез и метаболизм коэнзима Q10

Синтез CoQ10 эндогенно протекает в четыре этапа: 1) синтез бензохинонового кольца из тирозина [64] или фенилаланина, 2) синтез изопреновой латеральной цепи 3) конденсация бензохинонового кольца и изопреновой латеральной цепи [6] 4) модификация бензохиноновой части [56]. Синтез латеральной цепи начинается с ацетил-Ко-А и проходит через большую часть реакций синтеза холестерина. Основным ферментом, контролирующим эту последовательность, является 3-гидрокси,3-метил глутарил - кофермент А редуктаза (ГМГ-КоА-редуктаза), ответственная за синтез мевалоновой кислоты

(Рисунок 1).

Мевалонатный путь включает в себя цепь реакций, начальной точкой которого является молекула ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА), а конечной - фарнезилпирофосфат – субстрат к синтезу CoQ10, холестерина, долихола и некоторых белков [57, 58]. Таким образом, цепочка преобразований ацетил-КоА в фарнезилпирофосфат является общей для всех этих веществ. Примечательным здесь является то, что последовательность биосинтеза идентична для нескольких липидов, из чего можно было бы сделать вывод, что синтез одного липида будет значительно влиять на синтез остальных. Тем не менее, липиды мевалонатного пути синтезируются с разной скоростью и в разных количествах, что требует дополнительной как центральной регуляции, так и регуляции конечными продуктами. Данный путь синтеза отличается от других регуляторными ферментами после этапа формирования фарнезилпирофосфата.

Первая ступень мевалонатного пути включает конденсацию трёх молекул ацетил-КоА и 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзима А (ГМГ-КоА), который образуется при помощи ацетоацетил-КоА тиолазы и ГМГ-КоА синтазы. Далее, ГМГ-КоА редуктаза преобразует ГМГ-КоА в мевалонат. После тщательного изучения ГМГ-КоА редуктазы был сделан вывод, что она является основным регуляторным ферментом в синтезе холестерина [59].

На следующем этапе мевалонат претерпевает фосфорилирование при помощи мевалонат киназы и фосфомевалонат киназы, преобразуясь в мевалоната фосфат, который является регулятором пролиферации клеток и синтеза ДНК. Декарбоксилирование мевалоната фосфата приводит к образованию изопентенилпирофосфата, который является не только прекурсором фарнезилпирофосфата, но и основным «кирпичиком» биосинтеза долихола и латеральной цепи CoQ10. Фарнезилпирофосфат синтаза катализирует превращение изопентенилпирофосфата и его изомера диметилаллилпирофосфата в фарнезилпирофосфат [60]. Фарнезилпирофосфат, в свою очередь, при помощи транс-пренил-трансферазы превращается в декапренилпирофосфат, который,

соединяясь с 4-ОН бензоатом, формирует CoQ10.

На данный момент практически нет данных о ферментах у человека, участвующих в конечных реакциях синтеза CoQ10.

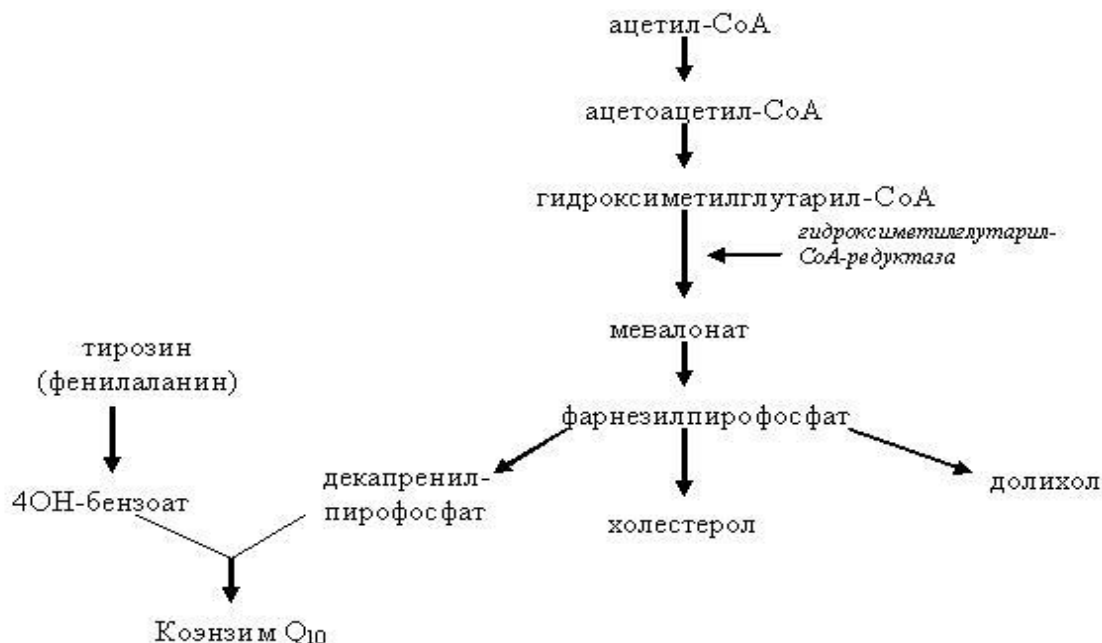


Рисунок 1 - Краткая схема синтеза убихинона

Источник: Grunler J. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins/ J. Grunler, J. Ericsson, G. Dallner// Biochim Biophys Acta. - 1994.- Vol.1212.- №3.- p. 259-277 [56]

1.3. Редокс-статус

Дисбаланс между антиоксидантами и окислителями в пользу последних, ведущий к повреждению клеток, называется окислительным стрессом. В клетке существуют специальные механизмы, поддерживающие редокс-гомеостаз: соотношение между внутриклеточными восстановителями (донорами электронов) и окислителями (акцепторами электронов) [61]. Сохранение и поддержание редокс-гомеостаза является жизненно-необходимым.

Кроме того, одним из основных механизмов регуляции активности клеток является редокс-регуляция клеточных процессов [62].

CoQ10 способен самостоятельно восстанавливать свою антиоксидантную

активность, а именно: из окисленной формы (убихинон) переходить в частично восстановленную без радикалов Q- убисемихинон, а далее в восстановленную форму (убихинол) (Рисунок 2). Поэтому соотношение убихинол Q10/убихинон Q10 (редокс-статус) может рассматриваться как один из важных показателей состояния антиоксидантной системы организма.

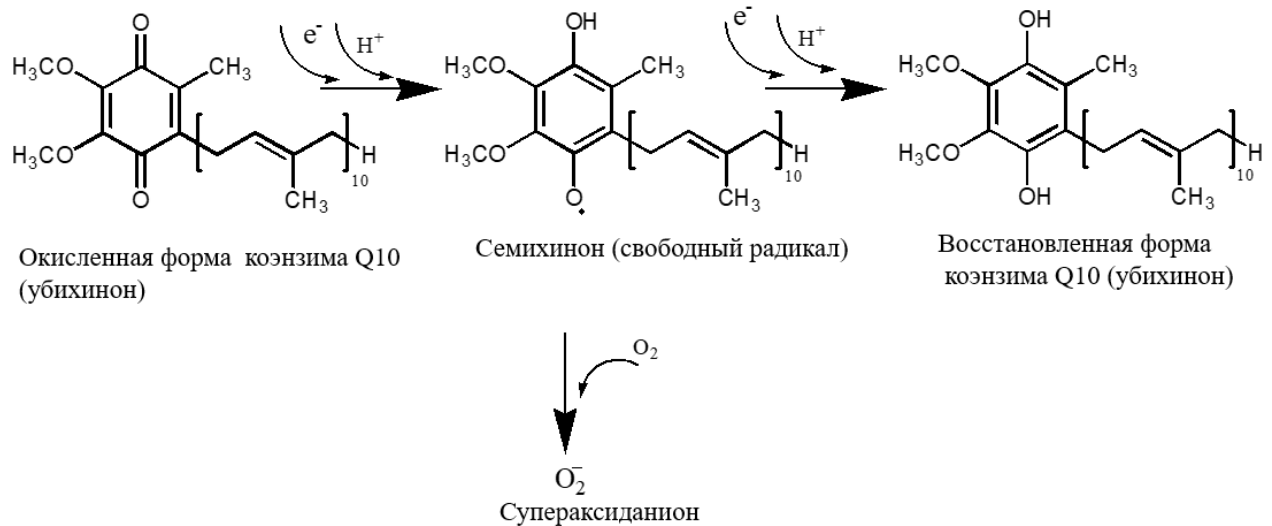


Рисунок 2 - Схема окислительно-восстановительных превращений CoQ10

Источник: Составлено на основе Quinn P.J. Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q/ P.J. Quinn, J.P. Fabisiak, V.E. Kagan// Biofactors. - 1999.- Vol.9.- №2-4.-p. 149-154 [48]

Чтобы проследить изменение редокс-статуса коэнзима Q₁₀, следует рассмотреть механизм функционирования Q-цикла. Впервые Q-цикл был предложен Питером Митчеллом. В настоящее время измененная схема Митчелла представляет собой механизм, с помощью которого цитохром редуктаза (дыхательной цепи) участвует в биохимической генерации протонов или рН градиента, который, в свою очередь, требуется для биохимического синтеза АТФ.

Q-цикл представляет собой серию последовательных реакций окисления и восстановления коэнзима Q₁₀, между формами убихинона и убихинола, которая приводит к свободному движению протонов через липидный бислой, а в случае митохондрий через внутреннюю митохондриальную мембрану. Следует отметить, что Q-цикл неразрывно связан с дыхательной цепью переноса электронов.

Дыхательная цепь состоит из трех белковых комплексов (I, III и IV),

встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану, и двух молекул – переносчиков: убихинона и цитохрома С. Компоненты дыхательной цепи катализируют перенос электронов от НАДН + H⁺ или убихинола на молекулярный кислород [63].

Цитохром-bc₁-комплекс (комплекс III) электронно-транспортной цепи, также известный, как Q-цитохром С оксидоредуктаза или, проще, цитохром редуктаза – это сложная структура, которая функционирует для принятия электронов от убихинола и их передачи другому электронному переносчику: цитохрому С. Комплекс III состоит из 3 субъединиц: 1) цитохром С1, который содержит одну гемм-группу, 2) цитохром b, который состоит из двух разных гемм-групп и 3) железосерный белок Риске, который является ключевым компонентом цепи переноса электронов, где расходятся 2 электрона (Рисунок 3). Процесс, с помощью которого электроны переносятся от убихинола к цитохрому С называется Q-циклом.

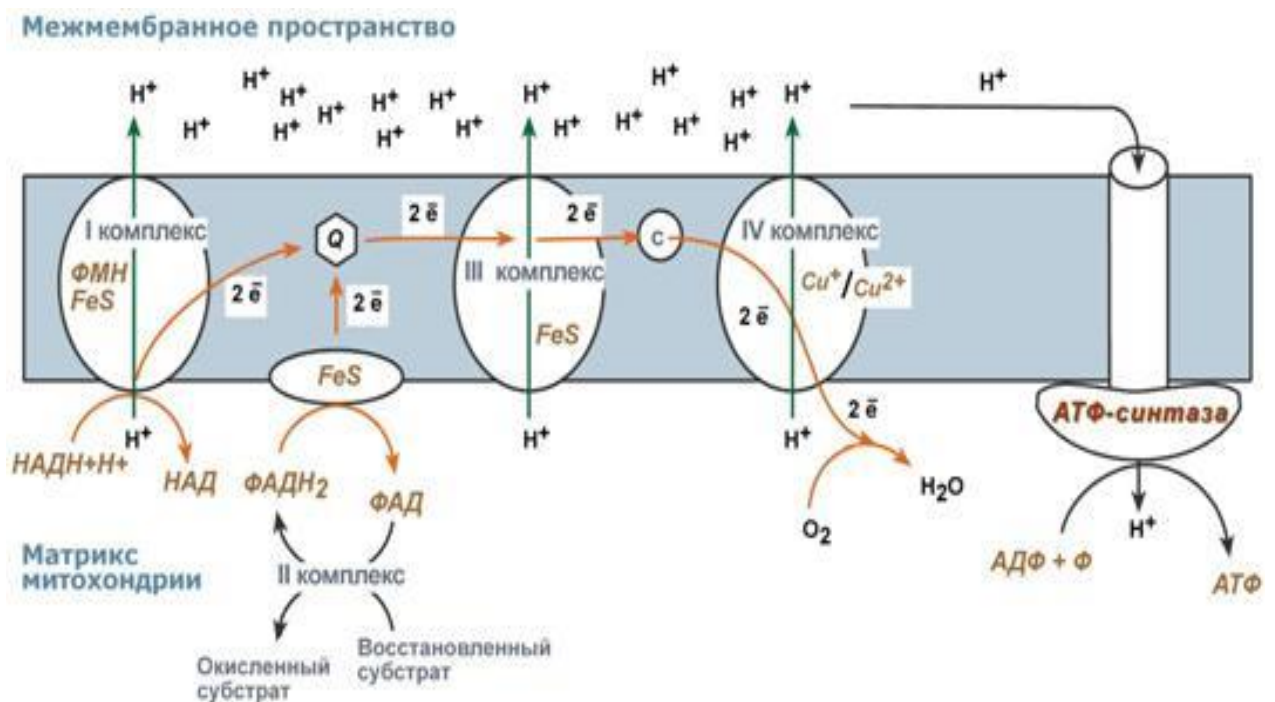


Рисунок 3 - Схема дыхательной цепи

Источник: Кольман Я. Наглядная биохимия/ Я. Кольман, К.Г. Рем. - Москва: М.: Мир, 2000. - 469 с. [8].

Этот цикл состоит из двух мини-циклов. В первом мини - цикле молекула убихинола присоединяется к комплексу III и отдаёт ему два электрона. Один из этих электронов двигается к центру Риске, затем к цитохрому C1 и к цитохрому C. Следует отметить, что цитохром C, в отличие от убихинона, может переносить только один единственный электрон. Другой электрон проходит совершенно другой путь через гемм-группы цитохрома b и далее к убихинону, чтобы сформировать частично восстановленную форму: семихинон. Два протона убихинола попадают в межмембранное пространство.

Во втором мини-цикле другой убихинол присоединяется к комплексу III. Во время цикла два протона перемещаются в межмембранное пространство, а два электрона проходят через те же самые пути, что и в первом мини-цикле: Электрон, который переносился к центру Риске, восстанавливает второй цитохром C, в то время как второй электрон переносится к радикалу семихинона и формирует полностью восстановленный хинон (убихинон должен принять два протона из матрикса, чтобы сформировать убихинол). Таким образом, один Q-цикл восстанавливает две молекулы цитохрома C, формирует одну молекулу убихинола, выталкивает 4 протона в межмембранное пространство и забирает два протона из матрицы (Рисунок 4).

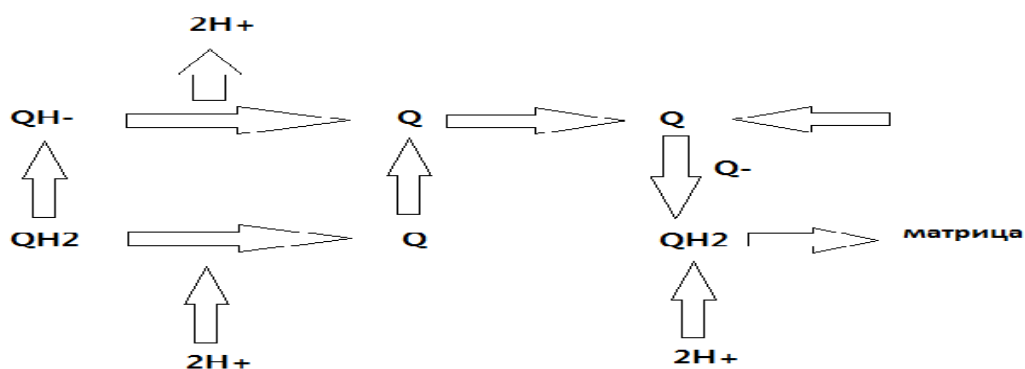


Рисунок 4 - Схема Q-цикла

Источник: Crane F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10/ F.L. Crane // J Am Coll Nutr. - 2001.- Vol.20.- №6.-p. 591-598. [49]

Побочным эффектом реакций Q-цикла можно назвать продукцию супероксида. Первичная молекула, ответственная за продукцию супероксида в митохондриях – убисемихинон. Вступая в реакцию с кислородом, убисемихинон окисляется до убихинона, а кислород, в свою очередь превращается в супероксид анион-радикал. Супероксид анион-радикал быстро и эффективно обезвреживается эндогенными антиоксидантами организма: супероксид дисмутазой и каталазой. Однако, реактивные формы кислорода, которым удалось избежать детоксикации, могут реагировать с большими макромолекулами, ведя к появлению таких абберантных молекул, как: белковые карбонилы или пероксидированные липиды, которые дисфункциональны и потенциально нарушают процессы, необходимые для поддержания и выживания клетки [64].

Таким образом, антиоксидантные системы представляют собой ключевой защитный механизм организма, и дисбаланс этих систем может являться причиной множества заболеваний. При этом, CoQ10 способен самостоятельно восстанавливать свою антиоксидантную активность, а именно: из окисленной формы (убихинон) переходить в частично восстановленную (убисемихинон), а далее в восстановленную (убихинол). В свою очередь, соотношение убихинол Q10/убихинон Q10 (редокс-статус) может рассматриваться как один из важных показателей состояния антиоксидантной системы организма. Установлено, что у практически здоровых лиц соотношение убихинол/убихинон составляет 95/5. При этом в доступной литературе отсутствуют данные об изучении редокс-статуса CoQ10 у больных с различными заболеваниями. Поэтому, в четвертую и пятую задачу настоящей работы включено определение редокс-статуса коэнзима Q10 у больных с сердечно-сосудистыми патологиями при приеме лекарственных средств из различных фармакологических групп, а также при приеме препарата CoQ10, Кудесана®.

На сегодняшний день представлено недостаточно литературных данных по определению редокс-статуса CoQ10, у здоровых лиц, а также у пациентов с различными патологиями. В исследовании 2016 года было проведено сравнение

как содержания CoQ10 в плазме крови здоровых добровольцев в зависимости от возраста, так и его редокс-статуса. Было показано, что у добровольцев старшего возраста (61-82 лет) концентрация CoQ10 уменьшается по сравнению с более молодыми лицами (41-60 лет): 0.885 ± 0.30 vs 0.830 ± 0.235 мкг/мл. Также, у лиц старшего возраста было отмечено смещение соотношения убихинол/убихинон в сторону окисленной формы. При этом, редокс статус рассчитывался как процент убихинона к общему CoQ10 ($13,7 \pm 2,0$) [52]. Miles и соавт., в свою очередь, в своем исследовании повторили выводы Yamashita и соавт. (1997), что соотношение убихинола к убихинону, в среднем, составляет 95:5.

1.4. Физико-химические свойства коэнзима Q10

Физико-химические свойства являются крайне важными для разработки эффективной методики определения исследуемых веществ в плазме крови (Таблица 3). При выборе способа пробоподготовки нужно учитывать такие свойства веществ, которые характеризуют их растворимость и полярность.

Мерой полярности вещества в воде является коэффициент распределения в системе октанол-вода ($\log P$). Высокие показатели $\log P$ у убихинона и убихинола указывают на высокую липофильность веществ и как следствие ведут к выбору органических растворителей для их изолирования.

Стоит отметить, что убихинон и убихинол хорошо растворяются в гексане, диэтиловом эфире, в смеси этанол:диэтиловый эфир, хуже в пропаноле, этаноле, этилацетате. Степень растворимости коэнзима Q10 увеличивается при возрастании температуры. Раствор убихинона в гексане стабилен не менее 1 месяца при хранении при -20°C [65].

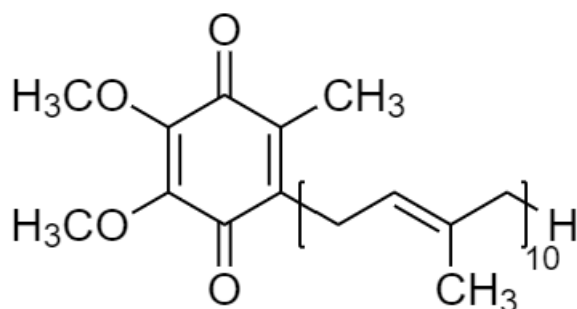
Таблица 3 - Физико-химические свойства убихинона и убихинола

Вещество	Описание	M, г/моль	t°пл, °C	pK _a	Log P (октанол/ вода)	RedOX, CoQ10/CoqQ10H2, В	Растворимость
Убихинон	Желто-оранжевый кристаллический порошок	863,34	48 - 51	-4,7	10	0,11	Растворим в эфире, слабо растворим в спирте, не растворим в воде
Убихинол	Белоснежный порошок	865,36	49	-4,7	9,68		Практически не растворим в воде

CoQ10 обладает хорошо выраженными электрохимическими свойствами, что может быть использовано для его количественного определения. В работе [66] была показана возможность использования такого электроаналитического метода, как вольтамперометрия. Однако, данный метод применялся для определения CoQ10 в фармацевтических и косметических продуктах. Однако, отсутствуют сведения об использовании данного метода для определения CoQ10 в плазме крови. Была предложена схема катодной вольтамперометрии с электровосстановлением кислорода. В качестве рабочего электрода использовался стеклоуглеродный электрод, в качестве электрода сравнения – хлорид-серебряные электроды.

Коэнзим Q10 состоит из хинонового кольца и гидрофобной изопреновой цепочки. Хиноновая группа позволяет коэнзиму Q10 функционировать как переносчику электронов. Изопреновая же цепь обуславливает низкую полярность, которая способствует его быстрой диффузии через митохондриальную мембрану. Химические структуры убихинона и убихинола представлены на Рисунке 5 а и б.

a)



б)

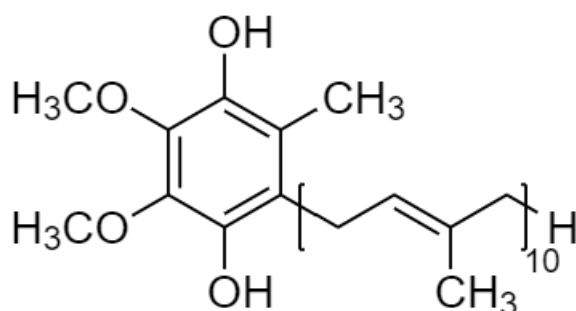


Рисунок 5 - Химическая структура убихинона (а) и убихинола (б)

1.5. Методы определения CoQ10 в плазме крови

Такие физико-химические характеристики CoQ10, как: большая молекулярная масса, высокая гидрофобность и легкая реакционная способность к окислению, наряду с его низкими концентрациями в биологических матрицах, делают его определение аналитически сложным.

Подходящий аналитический метод должен быть высокочувствительным и специфичным, чтобы быть способным низкие концентрации молекулы коэнзима в сложных матрицах. Аналитический метод также должен быть простым, быстрым, недорогим и подходящим для рутинной практики. Пробоподготовка должна гарантировать достаточную химическую стабильность с минимальными потерями.

Несколько аналитических методик определения CoQ10 в различных матрицах были обновлены в последние годы.

Основным методом определения эндогенного уровня CoQ10 является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Чаще всего используется ВЭЖХ в сочетании со следующими детекторами: ультрафиолетовым [20, 21, 66-71], электрохимическим [50, 72-76] и масс-спектрометрическим [23, 77-80, 81]. Интересно отметить, что из-за крайней нестабильности убихинола многие авторы избегают проводить разделение окисленной и восстановленной формы CoQ10, вместо этого прибегая либо к окислению убихинола, либо к восстановлению убихинона [21, 80].

1.5.1. ВЭЖХ с электрохимическим детектированием

Электрохимический детектор (ЭХ) считается достаточно чувствительным как для определения общего CoQ10, так и для отдельного определения его восстановленной и окисленной формы. Также, данный метод, по-видимому, является наиболее распространенным методом анализа CoQ10, особенно в биологических матрицах, из-за его высокой селективности и чувствительности, однако он является трудоемким и требует большого количества времени, что делает его непригодным для рутинного анализа.

В исследовании [73] использовали обращенно-фазовую колонку Lichrocart. Последовательно применяли два элюента: метанол:вода 98:2, содержащий хлорид цинка, натрия ацетат и уксусную кислоту. Второй элюент состоял из уксусной кислоты в смеси этанол:метанол:вода 49:49:2. Для предотвращения окисления подвижные фазы были дегазированы. При этом, были одномоментно определены как окисленная, так и восстановленная формы CoQ10.

В другой работе [67] перед внесением на колонку окисленной формы CoQ10 в экстракте плазмы восстанавливали до CoQ10H₂ при помощи натрия тетрагидробората в этаноле либо натрия. Концентрацию убихинона вычисляли по

разнице общего CoQ10 до восстановления и после восстановления. Разделение изучаемых веществ осуществлялось на обращенных фазах Phenomenex, Luna C18. При этом, в качестве подвижной фазы использовалась: - 0,3% NaCl в смеси этанол-метанол -7% HClO₄ (975:15:10). Практически во всех современных методах определения CoQ10 при помощи ВЭЖХ-ЭХ используется предварительное восстановление убихинона до убихинола и его последующее измерение [82].

Предел обнаружения в плазме составил 1-15 мкг/мл [83, 84]. Основным недостатком данного метода является длительный и трудоёмкий процесс пробоподготовки. Также, многие исследователи сталкиваются с проблемами потерь или окисления убихинола во время пробоподготовки, а также неиспользованием каких-либо внутренних стандартов, что делает выход весьма низким, а метод недостаточно точным [85].

1.5.2. ВЭЖХ со спектрофотометрическим (УФ) детектированием

В других исследованиях для определения общего CoQ10 использовали метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором. ВЭЖХ-УФ получил высокую востребованность, благодаря относительной дешевизне и широкой доступности. В данном случае метод оказался недостаточно чувствительным для одновременного определения убихинона и убихинола в биопробе [22, 86]. Европейская Фармакопея рекомендует измерять убихинон на длине волны $\lambda = 275$ нм, а убихинол на $\lambda = 290$ нм. Поскольку CoQ10 является липофильным соединением, то для разделения убихинона и убихинола применяли в основном обращено-фазовые варианты хроматографии.

Авторы статьи [21] провели хроматографический анализ образцов плазмы крови на колонке Supelcosil LC 18 при элюировании смесью этанол:метанол (65:35) со скоростью 1 мл/мин с целью определения общего CoQ10 в концентрации 0,29 мкг/мл. Предварительно восстановленная форма CoQ10 – убихинол - была окислена при помощи пара-бензохинона до убихинона, а далее измерялся общая

концентрация CoQ10. Небольшое время удерживания делает анализ быстрым, а также позволяет разделить CoQ10 с другими компонентами плазмы.

В работе [87] описано определение общего коэнзима Q10 в плазме крови путём разделения на хроматографической колонке Hypersil C18 при элюировании 10% изопропанолом в метаноле и обнаружения при помощи УФ-детектора с $\lambda = 275$ нм. В этом исследовании использовались предколонки. Предел обнаружения составил 0,1 мкг/мл.

Использование данной методики также позволяет одновременное определение убихинона с транс-ретинолами и α -токоферолом в плазме крови, что и было показано в исследовании [20]. Работа проводилась на обращенно-фазовой колонке C18. В качестве подвижной фазы использовалась смесь метанол:гексан (85:15), скорость потока составила 1 мл/мин. Определение проводилось с переключением длин волн. Данный метод позволил получить степень извлечения, равную 88% для убихинона.

Также практикуется совместное применение УФ и ЭХ детекторов для улучшения селективности разделения. Некоторые исследователи использовали комбинацию ВЭЖХ с УФ- и ЭХ-детекторами для одновременного измерения убихинона, убихинола и токоферолов [23, 88]. При использовании данного метода исчезает фактор интерференции со стороны других веществ плазмы.

Таким образом, определение CoQ10 возможно, используя спектрофотометрический детектор, однако этот детектор обладает более низкой чувствительностью, чем электрохимический детектор.

Относительно недавним открытием является микроэмульсионная жидкостная хроматография. Хроматографическое определение проводилось при помощи колонки SynergiGemini (4,6×250 мм). Поскольку CoQ10 является липофильным соединением, был применен метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии, где в качестве подвижной фазы использовалась микроэмульсия типа «вода в масле». Положительной чертой микроэмульсии является более низкое давление в системе по сравнению с другими подвижными фазами. Предел

обнаружения убихинона и убихинола при этом типе анализа более низкий по сравнению с обычной обращенно-фазовой хроматографией: 20 нг/мл и 100 нг/мл соответственно [9, 89]. Таким образом, можно сделать вывод, что микроэмульсионная жидкостная хроматография является более чувствительной для одновременного определения убихинона и убихинола в плазме крови по сравнению с ВЭЖХ-УФ.

1.5.3. ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

Сообщалось об использовании ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентным детектором для количественного определения CoQ10 в биологических образцах, таких как кровь [74], плазма, гомогенат печени и моча [90, 91]. ВЭЖХ в сочетании с флуорофотометрическим детектором широко используется для определения различных веществ в биологических образцах из-за высокой селективности и чувствительности. Сообщалось, что этилцианоацетат использовался для предколоночной дериватизации CoQ10 в сыворотке для флуориметрического обнаружения в ВЭЖХ, однако в данном методе требовалось 20 часов для флуоресцентной дериватизации.

Флуоресцентный детектор обладает высокой чувствительностью и селективностью, однако исследуемая молекула должна обладать флуоресцентными свойствами. В случае CoQ10 введение флуорофорной группы необходимо, т.к. молекула убихинона сама по себе не проявляет флуоресценции. Было показано, что убихинон и убихинол образуют продукты флуоресценции в щелочных условиях при взаимодействии с 2-цианоацетамидом. Реакционная смесь из CoQ10 давала флуоресценцию с максимальными длинами волн возбуждения и испускания при 442 нм и 549 нм соответственно. Считалось, что эта реакция протекает по реакции Крейвена.

Элюент представлял собой смесь ацетонитрил:2-пропанол (45:55 v:v), содержащую 1 ммоль/л 2-цианоацетамида и 3 ммоль/л трифторацетата калия. Его

подавали насосом А со скоростью потока 0,8 мл/мин. Объем вкола составлял 20 мкл. CoQ10 и CoQ10H2 от других флуоресцентных веществ в плазме отделяли на колонке с ODS при 25°C. Элюат смешивали с 20 ммоль/л гидроксида калия в этаноле в виде щелочного раствора, подаваемого насосом В при скорости потока 0,2 мл/мин. Смесь подвергали реакции в спирали, затем помещали в печь при 85°C. После охлаждения в спирали интенсивность флуоресценции контролировали с помощью флуоресцентного детектора.

Также, было показано, что 2-цианоацетамид является полезным реагентом для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с постколоночной флуоресцентной дериватизацией CoQ10 и CoQ10H2 в крови. CoQ10 показал линейный ответ в диапазоне 0,32–1276 нг, а предел обнаружения ($S/N=3$) составил 0,16 нг. Кроме того, предварительная обработка образца путем депротеинизации и экстракции CoQ10 и CoQ10H2 из плазмы с использованием 1-пропанола с формиатом калия была эффективной для отличного отделения CoQ10 и CoQ10H2 от других флуоресцентных веществ в крови. Считалось, что эта простая и быстрая предварительная обработка минимизирует окисление CoQ10H2. С другой стороны, CoQ10 и CoQ10H2 в образцах плазмы, полученных путем укола пальца, были обнаружены и в венозной крови, полученной путем венепункции [92].

1.5.4. ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектированием

Метод основан на хемилюминесцентном обнаружении люминолом супероксидного аниона, образующегося в результате реакции окислительно-восстановительного цикла между убихиноном и дитиотреитом, восстанавливающего хиноны до семихиноновых радикалов. Затем семихиноновые радикалы превращают растворенный кислород в анион супероксида, который реагирует с люминолом с образованием хемилюминесценции. Система ВЭЖХ включала октиловую колонку с метанолом в качестве подвижной фазой. Убихинон, элюированный из колонки, смешивали одновременно с растворами дитиотреитола

и люминола и регистрировали генерированную хемиллюминесценцию с помощью хемиллюминесцентного детектора. Калибровочная кривая для стандартного раствора убихинона была линейной от 0,09 до 43,2 мкг/мл (0,45–216 нг на колонке) с коэффициентом корреляции 0,999, а предел обнаружения ($S/N=3$) составлял 26 нг/мл. Используя предложенный метод ВЭЖХ, пик убихинона в плазме человека можно было четко определить на хроматограмме без каких-либо помех со стороны других компонентов плазмы. Однако, недостатком данного метода является то, что остается невозможным отдельно определить убихинон и убихинол [93].

1.5.5. ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

В настоящее время метод ВЭЖХ-МС/МС является одним из высокоселективных и чувствительных, что необходимо для измерения низких концентраций эндогенного убихинона и убихинола в плазме крови для диагностики патологий. Соотношение m/z для убихинона составляет 880,7, а для убихинола - 882,7.

При обнаружении CoQ10 методом масс-спектрометрии использовались обращенно-фазовые колонки C18. В исследовании [78] использовали подвижную фазу, состоящую из смеси метанола с 5 мМ формиатом аммония. Соотношение m/z для убихинона составляло 863,7, а для убихинола - 882,7. Масс-спектрометр находился в режиме регистрации положительных ионов. Данный метод позволил определить как убихинол, так и убихинон. Интересно отметить, что в данной работе использовался метод сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (UPLC) в тандеме с масс-спектрометрией и одношаговой экстракцией пропанолом. Несмотря на то, что стабильность убихинола в пропаноле ограничена, упрощенный процесс экстрагирования и скорость хроматографирования (4,2 мин) позволяли сделать большое количество анализов.

Метод, примененный в данной работе, стал адаптацией метода [22] обычного ВЭЖХ - МС, где удалось достигнуть следующих пределов обнаружения: для

убихинона 5,49 нг/мл, а для убихинола - 15,8 нг/мл.

Авторы работы [81] пришли к выводу, что в качестве добавки к подвижной фазе лучше всего подходит метиламин. Площадь пика аналита, смешанного с 1-алкиламином была в пять раз больше, чем без него. В качестве подвижной фазы выбрали смесь метанол:изопропанол:муравьиная кислота в соотношении 45:55:0,05 с добавлением метиламина в концентрации 5 ммоль/л при скорости потока 0,2 мл/мин.

В отличие от использования электрохимического детектора, масс-спектрометр обладает более высокой чувствительностью. Авторы [79] провели анализ на колонке SynergiHydroRP при элюировании подвижной фазы, в состав которой входило 60% изопропанола и 40% ацетонитрила. Использовали режим химической ионизации при атмосферном давлении с регистрацией отрицательных ионов (напряжение коронного разряда 3кВ, скорость подачи газа 2,5 л/мин, температура источника 275°C). Достигнуты пределы обнаружения Q10H₂ и Q10, составившие 30 и 5 нг/мл, соответственно.

Другими авторами предложен метод одновременного определения убихинона и убихинола с помощью усиленной ионизации раствором хлорида лития (LiCl) в режиме селективного мониторинга множественных реакций (MRM). Ионизация раствором LiCl и использование режима MRM открыли новую страницу в количественном определении CoQ10. Соотношение m/z для убихинона составляло 870, а для убихинола – 872. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил:изопропанол 55:45 при скорости потока 0,5 мл/мин. Для эффективности ионизации 0,5 ммоль/л добавляли прямо в контейнер с подвижной фазой. Разработанная методика являлась простой, быстрой, универсальной и чувствительной. Её чувствительность была в 50 раз выше, чем у других методик. Единственное ограничение представляют следы CoQ9 в плазме крови человека, так как обычно CoQ9 используют как внутренний стандарт [77].

Продемонстрирована возможность одновременного определения окисленных и восстановленных форм коэнзима Q10 методом ВЭЖХ-МС без

протекания каких-либо вторичных процессов во время детектирования, в отличие от электрохимического (восстановительные процессы) или других видов детектирования (окисление убихинола во время анализа) [22].

Таким образом, в настоящее время существует множество методов количественного анализа CoQ10 в плазме крови, однако, одни из них не обладают достаточной для клинических исследований селективностью, специфичностью и чувствительностью, а при помощи других можно определить только общий CoQ10, прибегая либо к окислению убихинола, либо к восстановлению убихинона. Поэтому, в настоящей работе поставлена первая научная задача: разработать методику одновременного определения убихинона и убихинола в плазме крови пациентов методом ВЭЖХ.

1.5.6. Стабильность биопроб коэнзима Q10

Для начала, стоит отметить, что коэнзим Q10, содержащийся в плазме крови, является достаточно нестабильным веществом, концентрация которого меняется в зависимости от ряда факторов. Поэтому, отбор и хранение биопроб требуют соблюдения определенных условий.

Было показано, что физиологический уровень эндогенного убихинола в плазме крови снижается уже в первые сутки хранения при -20°C , а его полное окисление происходит к четвёртым суткам хранения. При этом, общее содержание CoQ10 остаётся неизменным [67]. Однако, было отмечено, что скорость окисления убихинола в убихинон увеличивается с увеличением температуры хранения [65, 70]. Изменения концентраций убихинона и убихинола в биопробах при различных условиях хранения представлены в Таблице 4 и Таблице 5.

Таблица 4 - Изменения концентрации убихинона (мкг/мл) в плазме крови при хранении

Условия хранения	0 часов	4 часа	8 часов	24 часа
Охлаждение льдом	0,021 ± 0,021	0,042 ± 0,030	0,071 ± 0,037	0,091 ± 0,031
Холодильник	0,021 ± 0,021	0,024 ± 0,022	0,047 ± 0,025	0,079 ± 0,031
Комнатная температура	0,021 ± 0,021	0,063 ± 0,040	0,097 ± 0,050	0,250 ± 0,119

Источник: Matsuo K. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood. /Kasai K, Hosoe K, et al.// Biomed Chromatogr. – 2016. –Vol.30. –№4. – p.500-2. [55]

Из представленных данных видно, что концентрация убихинона при хранении при комнатной температуре со временем увеличивается. В течении 24 часов она увеличивается в десять раз, хотя статистически значимая разница становится заметна уже на отметке в 8 часов ($p < 0,05$). Эти результаты подтверждают тот факт, что убихинол легко окисляется до убихинона воздухом или растворенным в крови кислородом при комнатной температуре. Однако, при охлаждении или хранении в холодильнике концентрации убихинона увеличивались медленнее. В среднем, в течение 24 часов концентрация убихинона при хранении в холодильнике увеличилась в 3,8 раз, а при охлаждении в 4,3 раза. Таким образом, окисление убихинола до убихинона можно замедлить и уменьшить при помощи низких температур.

Таблица 5 - Изменения соотношения убихинола к общему коэнзиму Q10 (%) в плазме крови при хранении

Условия хранения	0 часов	4 часа	8 часов	24 часа
Охлаждение льдом	99,3 ± 0,7	98,6 ± 1,0	97,0 ± 1,2	96,0 ± 1,7
Холодильник	99,3 ± 0,7	98,8 ± 1,1	98,3 ± 0,9	96,7 ± 1,2

Продолжение Таблицы 5

Комнатная температура	99,3 ± 0,7	98,0 ± 1,3	96,1 ± 1,1	91,1 ± 2,0
-----------------------	------------	------------	------------	------------

Источник: Matsuo K. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood. /Kasai K, Hosoe K, et al.// Biomed Chromatogr. – 2016. –Vol.30. –№4. – p.500-2. [55]

Среднее процентное соотношение убихинола к общему убихинону при любых условиях хранения уменьшается с увеличением времени хранения. Однако, степень уменьшения концентрации убихинола зависит от условий хранения. После 4 часов хранения в любых условиях не было отмечено статистически важной разницы в уменьшении соотношения восстановленной формы к общему коэнзиму. После 8 часов хранения обнаружили, что среднее процентное соотношение убихинола к CoQ10 статически отличалось от первоначального уровня при хранении пробы при комнатной температуре ($p < 0,01$), а также при охлаждении ($p < 0,001$). Тем не менее, после 24 часов при любых условиях хранения было отмечено значительное уменьшение концентрации убихинола.

Соответственно, лучшее время для определения убихинола и убихинона в плазме крови - не позднее 8 часов с момента отбора пробы [55, 82].

Существуют исследования, где показано, что убихинол нестабилен в крови и плазме, а соотношение убихинол/убихинон менялось уже в течение 1 часа после отбора образцов крови [78].

По причине крайней нестабильности убихинола было проведено множество исследований, целью которых являлись попытки стабилизации убихинола в биопробе. Для предотвращения окисления убихинола в сыворотку крови добавляли натрия аскорбат (5 мМ в 5 мМ фосфатном буферном растворе, pH 7,4) [83], бензохинон [94], бутилгидрокситолуол (ВНТ) [95], а также смесь лимонной кислоты, цитрата натрия и декстрозы [70]. Среди различных изученных антиоксидантов смесь аскорбиновой кислоты (5%) и ЭДТА (0,1%) показала лучшую защиту, чем такие фенольные антиоксиданты, как: бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуол, или пропилгаллат. Также, в данном исследовании

описывалось, что увеличение концентрации бутигидроксианизола (ВНА) и других фенольных антиоксидантов ускоряет разрушение CoQ10 [95].

Кроме того, в большинстве исследований для стабилизации проб тканей их диспергировали на холоде, в темноте с добавлением бутилгидрокситолуола для предотвращения окисления коэнзима Q10 [73, 79, 81, 83].

1.5.7. Пробоподготовка и экстракция коэнзима Q10

Как уже было отмечено, коэнзим Q10 и в окисленной, и в восстановленной форме - вещество нестойкое, а также фотолабильное. Таким образом, при анализе необходимо сохранить соотношение окисленной и восстановленной форм коэнзима. Для этих целей анализ, извлечение из биоматериала и приготовление стандартных растворов проводили на холоде, в посуде темного стекла и затемненном помещении или при тусклом свете.

Также, следует выделить, что коэнзим Q10 является липофильной молекулой, которая в плазме крови связана с липопротеинами и другими липофильными соединениями, которые могут мешать проведению анализа.

В основном, пробы крови отбирали в вакуумную пробирку с гепарином, цитратом натрия или ЭДТА, затем центрифугировали при 3000 G 10 мин и сразу же анализировали или хранили плазму до анализа при -80°C .

В некоторых исследованиях извлечение коэнзима Q10 из биологических жидкостей проводили методом жидкостной экстракции [74, 78]. Был сделан вывод, что наилучшие результаты приносит использование изопропанола или смеси этанол:гексан 2:5 [82]. Другой метод заключался в осаждении белков с дальнейшим выпариванием в атмосфере азота и суспендированием в смеси хлороформ-метанол 1:3 [73], а также охлажденным изопропанолом на ультразвуковой бане [79, 87], н-пропанолом [21] с последующим анализом экстракта.

В исследовании [87] было показано, что такие растворители, как метанол, ацетонитрил и 10% трихлоруксусная кислота не подходят для экстракции коэнзима

Q10 из-за их сильной полярности. Степень извлечения при такой экстракции была нулевой.

Другие авторы [67, 70] проводили многократную обработку органов, а также проб плазмы крови, смесью этанол (метанол): н-гексан (1:2:5) [70] с последующим упариванием гексанового слоя в токе азота и растворением в аликвоте этанола [74, 84], либо прямым анализом гексанового слоя. Непосредственный анализ гексанового слоя без процедуры выпаривания проводился по причине резкого снижения содержания убихинола и увеличения содержания убихинона после упаривания гексанового экстракта в токе азота, хотя на эти процедуры потребовалось всего несколько минут [55]. Поэтому, при анализе следует учитывать, что жидкостная экстракция с использованием гексана, за которым следует выпаривание, приводит к значительному окислению убихинола.

Из-за искажения результатов при использовании предыдущего метода, а также его длительности и трудоёмкости, широкое распространение получил метод одношаговой экстракции CoQ10, впервые применённый Mosca и соавторами в 2002 году. Данный метод заключается в окислении образца при помощи парабензохинона с последующим его извлечением пропанолом и прямым вколом в ВЭЖХ. Было установлено, что супернатант остаётся стабильным в течение трёх дней при температуре 22 градуса. Данный метод позволяет получить линейный отклик детектора в диапазоне концентраций 0,05-3,47 мМ. Предел количественного определения при использовании данного вида экстракции составляет 1,23 нмоль на 1 вкол. Степень извлечения данного метода составила 96 - 98,5%. Высокая липофильность пропанолола, а также смешиваемость с водой приводила к более полному извлечению, нежели при использовании изопропанолола или другого короткоцепочечного спирта [21]. Недостатком данного метода является невозможность оценить соотношение восстановленной и окисленной формы коэнзима Q10.

Для улучшения экстракции CoQ10 из биологической матрицы, а именно отделения CoQ10 от липопротеинов, к плазме крови добавляли поверхностно-

активные вещества, такие как додецил сульфат натрия или Тритон X-100, или Твин-20, а также изучали влияние температуры экстракции (4°C и 19°C) и типы пробирок (стекло и полипропилен) [70]. Было показано, что экстракция CoQ10 в полипропиленовой пробирке, твина-20 с концентрацией 3%, при 4°C смесью метанол: гексан по сравнению с экстракцией пропанолом обеспечило лучшую сохранность CoQ10 в пробе, а также хорошую воспроизводимость между повторами с коэффициентом вариации 4,3% и улучшение эффективности хроматографического разделения на 51,2% с УФ-детектированием. Кроме того, был сделан вывод, что экстракция пропанолом хорошо подходит при использовании ЭХ-детектора по причине его большей чувствительности. Для УФ-детектора при экстракции лучше использовать смесь этанол:гексан, так как пропанол работает больше как осадитель белков, не позволяя концентрировать пробу [83, 70].

Для выделения убихинола и убихинона из тканей, ткани гомогенизировали с физраствором или пропанолом, лиофилизировали, экстрагировали этанолом, н-гексаном [26, 31].

Основным методом измерения эндогенного уровня CoQ10 является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Чаще всего используется ВЭЖХ в сочетании со следующими детекторами: ультрафиолетовым [20, 21, 66, 67, 69, 70, 84, 87] электрохимическим [11, 72-74, 89, 96] и масс-спектрометрическим [77-81]. Интересно отметить, что из-за крайней нестабильности убихинола многие авторы избегают проводить разделение окисленной и восстановленной формы CoQ10, вместо этого прибегая либо к окислению убихинола, либо к восстановлению убихинона [21, 80]. Основные методики количественного определения CoQ10 представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Методики количественного определения CoQ10

Форма CoQ10	Пробо-подготовка	ПФ	Детектирование	Предел обнаружения	Автор
Убихинон + Убихинол	ЖЖЭ + выпаривание	метанол: вода 98:2, затем этанол: метанол:вода 49:49:2	ЭХ	-	[73]
Общий CoQ10	ЖЖЭ	0,3% NaCl в смеси этанол- метанол:7% HClO4 (975:15:10)	ЭХ	0,1 нг	[97]
Общий CoQ10	ЖЖЭ	этанол:метанол (65:35)	УФ	0,05 мкг/мл	[20]
Общий CoQ10	ЖЖЭ	метанол:гексан (72:28)	УФ	0,12 мкг/мл	[87]
Общий CoQ10	Осаждение белков	Изопропанол : метанол (60:40) + перхлорная кислоты + гидроксид натрия	УФ	0,1 мкг/мл	[67]
Общий CoQ10	ЖЖЭ с добавлением ПАВ	Метанол:гексан 85:15	УФ	-	[69]
Общий CoQ10	Осаждение белков	10% изопропанол в метаноле	УФ	0,05 мкг/мл	[70]
Общий CoQ10	ЖЖЭ	Метанол: н- гексан:изопроп анол (80:15:5, v/v/v	УФ	2,5 мкг/мл	[66]
Общий CoQ10	Осаждение белков	Метанол: этанол :изопропанол с добавлением ацетата аммония	МС	20 пг	[78]

Продолжение Таблицы 6

Убихинон	Осаждение белков	Ацетонитрил: изопропанол (55:45) +0,5 0.5 $\mu\text{M LiCl}$	МС/ МС	2,0 нг/г	[77]
Убихинол				4,0 нг/г	
Убихинон	Осаждение белков	Метанол: изопропанол: муравьиная кислота (44:55:0,05) + метиламин	МС/ МС	1 мкг/г	[80]
Убихинон	Осаждение белков, ЖЖЭ	5мМ формиат аммония в 100% метаноле	МС/ МС	5,49 нг/мл	[21]

1.6. Роль коэнзима Q10 в некоторых патологиях

Исследования, проведенные ещё в 1970 году Folkers и др. показали, что у 70-75% пациентов, страдающих заболеваниями сердца, был обнаружен пониженный уровень CoQ10 [29]. Также, циркулирующий уровень CoQ10 в крови был значительно ниже у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) и дилатационной кардиомиопатией [37]. Кроме того, сниженный уровень CoQ10 в миокарде наблюдался у больных с аортальным стенозом, митральным стенозом, диабетической кардиомиопатией, тетрадой Фалло, дефектами сердечно-желудочной перегородки. Концентрация CoQ10 также уменьшалась в крови и ткани миокарда прямо пропорционально осложнению сердечных заболеваний [98].

Сердечные сокращения возникают при высвобождении ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР), что, в свою очередь, активирует сократительные белки. Во время диастолы Ca^{2+} из цитозоля попадает обратно в СР. Сердечное сокращение и поглощение кальция СР – это механизм, требующий энергии [99]. Расслабление сердечной мышцы также зависимо от активного поглощения ионов кальция СР. Этот процесс требует ещё большей энергии, чем сокращение.

1.6.1. Влияние концентрации CoQ10 в плазме крови на развитие патологий сердечно-сосудистой системы

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН). При ХСН были выявлены, помимо прочего, изменения в транспорте кальция [100]. Сердечная недостаточность может быть связана с уменьшением выработки энергии митохондриями, что затрудняет как поглощение Ca^{2+} СР, так и его транспорт к сократительным белкам. Так как CoQ10 участвует в транспорте электронов в дыхательной цепи митохондрий, в результате чего образуется энергия, он является важным компонентом для обеспечения энергетических потребностей истощенного сердца [101].

Первые исследования добавок с содержанием коэнзима Q10 начались в Японии в 1960 году [102]. С тех пор проводилось множество клинических исследований, включая плацебо-контролируемые с целью изучения корреляции патогенеза ХСН и содержанием CoQ10 в организме [19, 103-116]. Вследствие этих экспериментов установили, что уровень CoQ10 снижается при возрастании тяжести ХСН [28, 117, 118]. Предполагается, что существуют некоторые патофизиологические механизмы, при которых истощение CoQ10 в миокарде приводит к миокардиальной дисфункции и прогрессированию сердечной недостаточности. Во-первых, учитывая важную роль коэнзима в синтезе АТФ, уменьшение его митохондриального уровня может нарушить синтез АТФ и привести к систолической и диастолической дисфункции. Во-вторых, истощение митохондриального коэнзима может уменьшить способность миокарда к противостоянию АФК. В свою очередь, увеличение концентрации АФК служит триггером к увеличению митохондриальных пор и активирует апоптоз или некроз [119]. На этом основании было сделано заключение, что приём CoQ10 больными с ХСН существенно улучшает течение болезни, а также предупреждает тяжелые клинические осложнения [9, 120-122]. Коэнзим Q10 улучшает функциональное состояние у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Проведя

исследования по комбинированию приёма коэнзима Q10 с умеренными физическими нагрузками, ученые пришли к выводу, что приём добавки улучшает общее состояние у больных с сердечной недостаточностью, не приводя к побочным эффектам [123].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС). В основе дисбаланса между образованием свободных радикалов и недостаточной антиоксидантной защитой, ведущим к ишемическим-реперфузионным повреждениям, лежит оксидативный стресс. Шестидесят процентов клеточного объёма кардиомиоцитов занимают митохондрии, и соответственно, требуется много энергии АТФ для поддержания сократительных функций. Кроме того, митохондрии являются основным источником супероксида в кардиомиоцитах, особенно в условиях снижения доступности кислорода [124]. Исходя из этого, для лечения ИБС используются ЛС, содержащие CoQ10, которые обладают множеством молекулярных функций (генерирование АТФ, антиоксидантная защита и т.д.) в митохондриях [125].

CoQ10 также специфично связывается с сайтом на внутренней митохондриальной мембране, которая ингибирует митохондриальную Ca^{2+} -зависимую пору (изменяющая проницаемость мембраны митохондрий, МРТР) [126-128], которая является основным каналом для обмена Ca между митохондриями и средой [129]. Во время ишемии клеточная смерть ведет к нарушению ионного гомеостаза и окислительного фосфорилирования [130]. CoQ10 защищает креатинин киназу и другие ключевые белки от окислительной инактивации во время реперфузии. Эта функция является важной в сохранении клеточного метаболизма и сердечной деятельности [2, 131, 132].

Артериальная гипертензия. Доподлинно известно, что гипертонические состояния связаны с окислительным стрессом, который в кровеносных сосудах приводит к образованию радикалов супероксида, вступающих в реакцию с эндотелиальным оксидом азота с формированием пероксинитрита, что приводит к уменьшению уровня и доступности оксида азота [133, 134]. Это, в свою очередь, ослабляет способность эндотелия стимулировать расслабление гладких мышц

(вызываемое оксидом азота) с последующей вазоконстрикцией и повышением артериального давления.

Первостепенное действие CoQ10 в состоянии гипертонии - сосудорасширяющее из-за прямого воздействия на эндотелий и сосуды гладких мышц. Он вызывает снижение периферического сопротивления и уменьшение артериального давления при неизменном сердечном выбросе [135, 136]. Также, CoQ10 улучшает эндотелиальную функцию и снижает артериальное давление у больных диабетом и дислипидемией [137, 138]. Таким образом, можно заключить, что CoQ10 является мощным жирорастворимым антиоксидантом, который сохраняет доступность оксида азота, ослабляет вазоконстрикцию и уменьшает повышенное кровяное давление.

1.6.2. Роль коэнзима Q10 в развитии других заболеваний

Диабет. Ates и соавт. [139] заключили, что коэнзим Q10 защищает от связанных с возрастом изменений в окислительном стрессе и поддерживает функции сердечных митохондрий у крыс, содержащихся на диете, богатой полиненасыщенными жирными кислотами. Оксидативный стресс, сопровождающий диабет второго типа коррелирует со сниженным уровнем CoQ10 [140]. Во многих исследованиях при диабете второго типа отмечалось значительное уменьшение плазменного уровня CoQ10, коррелирующее с повышенным уровнем глюкозы, HbA1c и маркеров окислительного стресса [141]. Существует предположение, что у пожилых пациентов, страдающих диабетом второго типа (концентрация CoQ10 снижается до 0,35 мкг/мл или ниже), которые уже развили устойчивость к гипогликемическим препаратам, приём добавок, содержащих CoQ10 должен быть наиболее эффективным, в частности, должна улучшаться чувствительность к приему гипогликемических препаратов [142]. Маркеры окислительного стресса, включая окисленные ЛПНП, холестерол и редокс-регулирующий белок глутаредоксин значительно улучшались у пациентов

с первым и вторым типом диабета после приема добавок CoQ10 [143].

Онкологические заболевания. Проведенные исследования выявили низкую плазменную концентрацию CoQ10 у женщин, больных раком груди, а также у пациентов с меланомой и цервикальным раком.

Folkers и др. [144], а также Jolliet и др. [71] выявили более низкие уровни плазменного CoQ10 у пациентов с раком молочной железы. Также, Folkers и др. сообщили, что у 23% пациентов с раком молочной железы по сравнению с 4% без онкологических заболеваний обнаружили дефицит CoQ10 (концентрация CoQ10 крови ниже 0,5 мкг/мл). Возможно, что возраст или «менопаузальный» статус могут влиять на ассоциацию рака молочной железы с концентрацией CoQ10 [145].

Заболевания репродуктивной системы. Сообщили, что концентрация CoQ10 в семенной жидкости человека прямо пропорциональна с таким семенным параметром, как подвижность сперматозоидов и обратно пропорциональна окислительному стрессу [69]. Было установлено, что плазменный уровень CoQ10 напрямую влияет на фертильность у женщин [146]. Например, после 30 лет уровень CoQ10 в крови и тканях начинает уменьшаться [11], что совпадает с уменьшением фертильности и увеличением эмбриональных анеуплоидов. И действительно, уже была установлена связь между спонтанными абортами и низким уровнем CoQ10 в плазме крови [165]. Стоит отметить, что уровень CoQ10 в фолликулярной жидкости коррелирует с созреванием ооцитов во время оплодотворения *in vitro* [147].

Митохондриальные дисфункции и нейродегенеративные заболевания. Снижение эндогенного уровня CoQ10 часто приводит к дефициту выработки митохондриальной энергии, совмещенной с увеличением количества свободных радикалов [148]. Уменьшение уровня CoQ10 наблюдается при таких заболеваниях нервной системы, как: миалгический энцефаломиелит, синдром хронической усталости и фибромиалгия, нейропсихиатрические нарушения (депрессия) [148-151].

Таким образом, в экспериментальных и клинических исследованиях

установлено, что на концентрацию эндогенного CoQ10 может влиять ряд заболеваний: сердечно-сосудистые (ХСН, ИБС, гипертензия), метаболические (сахарный диабет) и другие. Концентрация CoQ10 в плазме крови пациентов с различными патологиями, принимающих различные препараты представлена в Таблице 7. Имеющиеся в литературе исследования немногочисленны, а полученные результаты, зачастую, неоднородны и не содержат информации по концентрации убихинона, убихинола и редокс-статуса коэнзима Q10. Поэтому, в настоящей работе поставлена научная задача: оценить влияние лекарственных средств различной химической структуры и фармакологического действия на концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Таблица 7 - Концентрация CoQ10 в плазме крови пациентов с различными патологиями, принимающих различные препараты

Диагноз	Кол-во больных	Применяемые препараты (группы)	Сопутствующие заболевание	Уровень CoQ10, мкг/мл	Автор
ХСН NYHA II и III класс	21	Нитраты Ингибиторы АПФ Бета-блокаторы Диуретики Варфарин Сердечные гликозиды Ацетилсалициловая кислота	Гиперхолестеринемия, Артериальная гипертензия	$0,82 \pm 0,5$	[120]
ХСН NYHA II и III класс	35	Амиодарон Ингибиторы АПФ Нитраты Диуретики Варфарин Гидралазин	Не включали пациентов с миокардитом, инфарктом миокарда (в последние 3 месяца)	$0,7 \pm 0,05$	[106]

Продолжение Таблицы 7

ХСН NYHA II класс	236	Ингибиторы АПФ Бета-блокаторы Статины	Гипертензия, Сахарный диабет	0,68	[152]
ИБС	38	Бета-блокаторы Статины Ацетилсалицило вая кислота Блокаторы кальциевых каналов	Гиперхолестерин емия, Гипертензия Инфаркт миокарда в анамнезе	0,63±0,0 4	[37]
Артериальная гипертензия	76	Ингибиторы АПФ Диуретики	Гиперхолестерин емия	0,47±0,1 9	[131]
Острый инфаркт миокарда	55	Клопидогрел Ацетилсалицило вая кислота Бета-блокаторы Ингибиторы АПФ	Заболевания ССЗ	0,256±0, 123	[101]
Гипертиреоз	17	Нет данных	Нет данных	0,45 ± 0,03	[153]
Гипотиреоз	25	Нет данных	Нет данных	1,04 ± 0,07	[154]
Гипо андrenaлизм	38	Гидрокортизон	Гипотензия Гипонатриемия	0,67 ± 0,06	
Гипогонадизм	26	Нет данных	Нет данных	0,66 ± 0,06	
Сахарный диабет	28	Оральные противодиабети ческие	Исключали пациентов с поражениями печени, почек атеросклерозом и инфекциями	0,52 ± 0,09	[143]

1.7. Влияние некоторых ЛС на уровень эндогенного коэнзима Q10

Антигипертензивные препараты и β-блокаторы. В результате исследований было выявлено, что некоторые американские и японские пациенты с

гипертонической болезнью, в том числе многие из тех, кто не принимал антигипертензивную терапию, имели дефицит CoQ10. Было протестировано восемь антигипертензивных препаратов, чтобы выяснить механизм ингибирования двух митохондриальных коферментов Q10, ферментов сердечной ткани, сукциноксидазы и НАД-оксидазы. Диазоксид и пропранолол значительно ингибируют CoQ10-сукциноксидазу и CoQ10-НАДН-оксидазу, соответственно. Метопролол не влияет на сукциноксидазу, но ингибирует НАДН-оксидазу сильнее пропранолола. Гидрохлоротиазид, гидралазин, клонидин также подавляют CoQ10-НАДН-оксидазу. Резерпин не ингибирует CoQ10-фермент, а метилдопа оказалась очень эффективным ингибитором сукциноксидазы. Международно признанные клинические побочные эффекты пропранолола могут быть связаны, в частности, с ингибированием CoQ10-ферментов, которые необходимы в биоэнергетике сердечной функции [54].

Статины. Статины широко применяются для лечения гиперхолестеринемии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Эти препараты ингибируют фермент ГМГ-КоА-редуктазу, которая играет основную роль в выработке холестерина в печени [68, 155] и является побочной цепью синтеза Q10. Проводились различные исследования, в которых пытались выяснить, как влияет приём статинов на уровень CoQ10.

В результате общего пути биосинтеза синтез как холестерина, так и кофермента Q10 тормозится при лечении статинами [156-159]. Хотя, в общем, статины считаются безопасной группой препаратов, были зарегистрированы следующие наиболее часто встречающиеся побочные эффекты: опорно-двигательные (повышение уровня креатинкиназы, миопатия, дерматомиозит и рабдомиолиз [88, 160]; артралгия, миалгия и разрывы сухожилий [161, 162]; ускоренное прогрессирование катаракты [163]; а также нарушения клеточного энергетического обмена, которые приводят к развитию миопатии и другим мышечным симптомам [164-166].

В одном из исследований было продемонстрировано, что добавка CoQ10

может предотвратить неблагоприятные эффекты статинов. В ранее проведенных исследованиях у здоровых добровольцы, получавших симвастатин в течение 4 недель, обнаружили снижение уровня CoQ10 на 30% [167, 168]. Результаты других исследований показывают, что введение статинов крысам с ожирением резко снижало уровень CoQ10, подтверждая CoQ10-истощающее действие статинов. Совместное введение CoQ10 и статинов уменьшало массу тела и вес печени дозозависимым образом. Кроме того, единовременное введение статинов с CoQ10 значительно уменьшало концентрацию креатинкиназы в сыворотке. Также, было замечено, что введение CoQ10 достоверно снижало уровень сывороточной аспаратаминотрансферазы (АСТ), повышенной статином.

В различных клинических исследованиях [169] показали, что применение CoQ10 значительно облегчало степень статин-индуцированной миопатии. Позднее, Kim и соавт. сообщили, что повышение уровня креатинкиназы в сыворотке двух пациентов, которых лечили ловастатином, было остановлено при помощи приёма CoQ10 [108]. Одно из последних клинических исследований с участием 32 пациентов (15 женщин и 7 мужчин), лечившихся от гиперлипидемии статинами, показало, что добавка с содержанием CoQ10 ослабляет миопатические симптомы, вызванные лечением статинами [170]. В исследовании проанализировали влияние добавки CoQ10 на уровни АСТ, аланинаминотрансферазы (АЛТ) и креатинкиназы в сыворотке крови [171-173]. Также, сообщается, что истощение CoQ10 во время терапии статинами может быть связано с субклональной кардиомиопатией, и что это состояние обратимо при экзогенном введении CoQ10 [37, 165, 174].

Таким образом, установлено, что ЛС различной химической структуры и фармакологического действия могут влиять на концентрацию эндогенного CoQ10. Однако, на данный момент наблюдается недостаток и неоднородность данных о влиянии различных групп ЛС на концентрацию CoQ10. Поэтому, в настоящей работе представлены научные задачи по оцениванию влияния лекарственных средств различной химической структуры и фармакологического действия –

амлодипина (блокатор кальциевых каналов), аторвастатина, (статины), этоксидола (антиоксидант) – на эндогенную концентрацию общего CoQ10 у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

1.8. Кудесан®

Кудесан® или убидекаренон является антиоксидантным и кардиотоническим средством негликозидной структуры. Фармацевтическая субстанция представляет собой капли для приема внутрь желтовато-оранжевого цвета с легкой опалесценцией.

Принимая во внимание, что CoQ10 имеет довольно сложную химическую структуру, фармацевтические формы, содержащие CoQ10 должны быть смоделированы с особой тщательностью, чтобы получить приемлемый продукт с точки зрения биодоступности и эффективности. Качество и стабильность продукта, а также возможные взаимодействия лекарственного средства и вспомогательных веществ, которые могут повлиять на производственный процесс должны быть тщательно изучены [74].

Исследования фармакокинетики Кудесана® [175] указывают на медленную абсорбцию CoQ10, связанную с большим молекулярным весом и гидрофобностью. Время до достижения максимальной концентрации в плазме составляло 3-4 часа. Причем, данный фармакокинетический параметр не отличался при изучении CoQ10 в виде порошка и солюбилизированной формы. Однако, такие параметры, как: средние значения концентрации в плазме в течение суток после приема, максимальная концентрация, а также площадь под кривой - были в несколько раз выше у солюбилизированной формы. При сравнении биодоступности CoQ10 в качестве солюбилизированной формы и порошка, биодоступность первой составляла 264%. Соответственно, принимая во внимание физико-химические свойства CoQ10 и его низкую биодоступность в качестве порошка, Кудесан® не только показывает большую в 3 раза биодоступность, но и приводит к увеличению

содержания CoQ10 в крови и миокарде [176,177]. При внутривенном введении Кудесана® максимальная концентрация общего убихинона составляла $282,6 \pm 5,3$ мкг/мл, убихинона $228,8 \pm 10,4$ мкг/мл и убихинола $53,8 \pm 6,4$ мкг/мл через 5 минут после введения. Концентрация снизилась двукратно через $8,3 \pm 1,5$ после инъекции [89].

В клиническом исследовании Кудесан® применяли у больных ХСН II и III функциональных классов. Исследователи отметили, что при применении Кудесана® в дозе 90 мг в сутки содержание CoQ10 в крови повышается до +83%. Кроме того, улучшался средний показатель функционального класса ХСН через 6 месяцев приема (у 9,9% пациентов), а также общее клиническое состояние пациентов. Также наблюдали прирост фракции выбора левого желудочка (+3,1% против 1,3% группы плацебо) и положительное влияние на размер камер сердца. В другом исследовании 50 пациентов с ИБС, стенокардией напряжения II и III функциональных классов принимали Кудесан® по 20 капель в день в течение 2 месяцев. После проведенного лечения было отмечено улучшение показателя качества жизни пациентов, снижение уровня ЛПНП, снижение уровня общего холестерина [177].

1.9. Выводы по главе

1. Коэнзим Q10 выполняет ряд важных функций в организме: является основным компонентом цепи переноса электронов в митохондриях, играет важную роль в синтезе аденозинтрифосфата (АТФ). Также, CoQ10 действует как антиоксидант, защищающий плазматическую мембрану от ПОЛ и обладающий более сильным антиоксидантным потенциалом, чем β -каротен и α -токоферол. Коэнзим Q10 существует в двух формах: окисленная (убихинон) и восстановленная (убихинол), обладающая непосредственной активностью против окислителей.

2. В настоящее время существует множество методов количественного анализа CoQ10 в плазме крови, однако, одни из них не обладают достаточной для

клинических исследований селективностью, специфичностью и чувствительностью, а в других определяют только общий CoQ10, прибегая либо к окислению убихинола, либо восстановлению убихинона. Во многих исследованиях наименование CoQ10 ассоциируют как с окисленной формой: убихиноном, так и с суммарным CoQ10. Поэтому, представляется достаточно сложным дифференцировать объект исследования.

3. 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. В большинстве исследований за нормальную концентрацию общего CoQ10 в плазме крови принято считать от 1,0 до 1,5 мкг/мл. Однако, в исследовании Langsgoijen и соавт. [109] показал, что при приеме добавок, содержащих CoQ10, его уровень может подниматься до 3,02 мкг/мл и до 4,11 мкг/мл, согласно исследованиям Niklowitz [52]. Также, можно отметить, что с возрастом отмечается уменьшение плазменного уровня CoQ10 как у мужчин, так и у женщин.

4. На концентрацию эндогенного CoQ10 может влиять ряд заболеваний: болезни эндокринной системы, сердечно-сосудистые (ХСН, ИБС, гипертензия) и другие заболевания. Результаты исследований плазменной концентрации эндогенного CoQ10 у больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) у разных авторов существенно, а иногда даже резко различаются – от 0,543 до $1,43 \pm 0,06$ мкг/мл.

5. Было выявлено, что ЛС различной химической структуры и фармакологического действия могут влиять на концентрацию эндогенного CoQ10. Однако, на данный момент наблюдается недостаток и неоднородность данных о влиянии различных групп ЛС на концентрацию CoQ10 [177].

6. Для проведения исследований редокс-статуса больных необходим метод количественного анализа убихинона и убихинола в плазме крови, обеспечивающий возможность достоверной адекватной оценки их концентраций в биожидкости при выбранных условиях исследования. Согласно литературным данным, редокс-статус

CoQ10 у здоровых лиц, в среднем, составляет 95:5 (убихинол:убихинон) [14], что и принято считать за нормальный редокс-статус. Однако, Niklowitz и соавт. определили, что редокс-статус может также незначительно изменяться в зависимости от возраста, например у здоровых добровольцев от 18 до 40 лет он составляет 87,3:12,7; от 41 до 60 лет 87,2:12,8; от 61 до 82 лет процентное содержание убихинона составляет 13,7 %.

7. На основании проведенного анализа литературных данных обоснованы научные задачи настоящей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, исследуемые объекты

Анализ проб с целью определения убихинона и убихинола в плазме крови при помощи ВЭЖХ-УФ проводился на ВЭЖХ Agilent 1200 следующей комплектации:

- Насос Agilent Binary Gradient Pump G 1312B (США);
- Автосэмплер Agilent Auto Sampler Hlg-ALS G 1367C (США);
- УФ - детектор Agilent 6140 (США);
- Термостат колонки Agilent G 1316B TCC (США);
- Колонка Eclipse XDB-C18 (150x4,6мм, 5μм)
- Обработка данных проводилась с применением программного обеспечения ChemStation.

Анализ проб с целью определения убихинона и убихинола в плазме крови при помощи ВЭЖХ-МС/МС проводился на ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ), Shimadzu (Япония) следующей комплектации:

- Насос Agilent Binary Gradient Pump G 1312B (США);
- Тройной квадрупольный масспектрометрический детектор LCMS-8040 Shimadzu (Япония)
- Колонка Luna C18 (50x4.6, 5μм), Phenomenex (США)
- Обработка данных проводилась с применением программного обеспечения LabSolutions.

Вспомогательные устройства:

- Весы аналитические Vibra HTR 220 CE
- Весы аналитические AUW120D, Шимадзу (Япония)
- Центрифуга Eppendorf (Германия)
- Центрифуга Heraeus Labofuge 400 (Германия)
- Роторный испаритель с вакуумным насосом KL1 (Чехия)
- Встряхиватель типа «Vortex»

- Дозаторы 10-100 $\mu\text{л}$, 100-1000 $\mu\text{л}$ Thermo Fisher Scientific (США)
- Баня водяная с терморегулятором с точностью терморегулировки $\pm 1^\circ\text{C}$

в интервале температур от $+25^\circ\text{C}$ до $+100^\circ\text{C}$;

В качестве стандартного образца использовали субстанцию CoQ10, Sigma Aldrich и субстанцию убихинола, Sigma Aldrich.

2.2. Реактивы и приготовление растворов

2.2.1. Реактивы и приготовление растворов для методики ВЭЖХ-УФ

В работе использовали химические реактивы: этанол «HPLC grade» (ООО Гатчинский спиртовой завод, Россия), пропанол-2 (Lab-Scan, Польша), эфир этиловый (Химмед, Россия). Для приготовления подвижных фаз использовали как индивидуальные растворители, так и их смеси в различных соотношениях.

2.2.2. Реактивы и приготовление растворов для методики ВЭЖХ-МС/МС

В исследовании были использованы следующие химические реактивы: ацетонитрил и абсолютный метанол (PanReac Applichem, Испания), бутилгидроксианизол (БНА) и 2,3-дихлоро-5,6-дициано-пара-бензохинон (DDQ) (Sigma-Aldrich, Германия), DL-альфа-токоферол ацетат (внутренний стандарт) (MP Biomedicals, США). Для приготовления подвижных фаз использовали как индивидуальные растворители, так и их смеси в различных соотношениях.

2.3. Приготовление модельных смесей

2.3.1. Приготовление модельных смесей стандартных разведений убихинона (CoQ10) для методики ВЭЖХ-УФ

На аналитических весах отвешивали навеску CoQ10 равную 0,05 г и растворяли в 5 мл этилового эфира. Далее раствор доводили этанолом до 50 мл (р-р А, концентрация 1 мг/мл). Растворы с концентрацией 100 мкг/мл; 50 мкг/мл; 25 мкг/мл; 10 мкг/мл; 7,5 мкг/мл; 5 мкг/мл получали из раствора А, путём разбавления этанолом раствора с концентрацией 1 мг/мл. Аналитический диапазон подбирался согласно данным о концентрации коэнзима Q10 у здоровых добровольцев, а также его концентрациям в препаратах, так как согласно литературным данным, методика ВЭЖХ-УФ оказалась нечувствительной для одновременного определения обеих форм CoQ10 у пациентов с патологиями.

2.3.2. Приготовление модельных смесей стандартных разведений убихинона и убихинола (CoQ10 и CoQ10H2) для методики ВЭЖХ-МС/МС

На аналитических весах отвешивали навеску CoQ10 равную 0,00250 г и растворяли в смеси изопропанол:этилацетат (1:1), а затем объем доводили до 50 мл тем же растворителем. Таким образом, получали исходный раствор с концентрацией 50 мкг/мл. Рабочие растворы с концентрациями: 25 мкг/мл; 10 мкг/мл; 7,5 мкг/мл; 5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 1 мкг/мл и 0,5 мкг/мл получали путём разбавления исходного раствора смесью изопропанол:этилацетат (1:1). Подобным образом готовили исходный и рабочие растворы убихинола. Аналитический диапазон методики ВЭЖХ-МС/МС отличался от ВЭЖХ-УФ, так как подбирался согласно данным о концентрации эндогенного CoQ10 как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с различными патологиями.

Следует принять во внимания, что работы с навеской и растворами

убихинола проводились в затемненном помещении из-за его чувствительности к свету [25]. Исходный и стандартные растворы хранились при -30°C . Для достижения комнатной температуры перед началом работы растворы хранили при комнатной температуре в темном месте.

Исходный раствор внутреннего стандарта готовили следующим образом: 0.0025г DL-альфа-токоферол ацетата растворяли в смеси изопропанол:этилацетат (1:1) и доводили до 25 мл тем же растворителем, чтобы получить раствор с концентрацией 100 $\mu\text{г}/\text{мл}$. 1 мл исходного раствора переносили в колбу и доводили до 25 мл тем же растворителем. Концентрация DL-альфа-токоферол ацетата в рабочем растворе составляла 4 $\mu\text{г}/\text{мл}$.

2.4. Дизайн исследования содержания убихинона и убихинола в плазме крови пациентов

Работа выполнена на базе кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол исследования больных был одобрен на заседании локального этического комитета Сеченовского Университета (протокол № 14-22 от 07.07.2022).

В исследование включены 142 пациента, из них 54 – практически здоровые лица и 88 больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые, в свою очередь, были разделены на две группы (I и II). Не было обнаружено значимых различий в содержании коэнзима Q10 по половому признаку, в соответствии с этим, пациенты не были разделены на группы по полу. Характеристика пациентов и подробная схема организации исследования представлена в Таблице 8. Во время исследования пациенты принимали препараты, перечисленные в Таблице 9.

В группу практически здоровых лиц были включены добровольцы, не имеющие заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной, мочевыделительной и

бронхолегочной систем, желудочно-кишечного тракта. За 10 дней до начала исследования добровольцы не принимали какие-либо лекарственные средства, витамины и биологически активные добавки. Средний возраст в данной группе составил $30,01 \pm 4,21$ года. У практически здоровых лиц проведено исследование эндогенного содержания общего CoQ10 в плазме крови.

В первую группу больных (I) были включены пациенты со следующими сердечно-сосудистыми заболеваниями: артериальная гипертензия 1 степени (140–159/ 90-99 мм.рт. ст., у 1,61% больных), 2 степени (160-179/100-109 мм.рт.ст, у 38,71% больных) и 3 степени ($\geq 180 / \geq 110$ мм.рт. ст., у 59,68% больных), 2 стадии (у 53,22% больных) и 3 стадии (у 46,78% больных), с умеренным (у 3,23% больных), высоким (у 38,71% больных) и очень высоким (у 58,06% больных) риском сердечно-сосудистых осложнений, ишемическая болезнь сердца (у 90,32% больных), стенокардия напряжения 1 (у 24,19% больных) и 2 (у 30,65% больных) функционального класса, хроническая сердечная недостаточность со II (у 57,15% больных) и III (у 43,75% больных) ФК (по NYHA). Средний возраст пациентов составлял $64,2 \pm 6,98$ лет.

В первой группе изучали эндогенное содержание убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови на фоне приема препаратов из различных групп с целью оценить влияние различных лекарственных средств на концентрацию CoQ10 и его редокс-статус. Для этого больные, согласно принимаемой терапии, были разделены на подгруппы А, Б, В, Г (Таблица 10).

В подгруппу А (n=15) были включены больные, которые принимали аторвастатин (статины) и бисопролол/метопролол (β -блокаторы). В подгруппу Б (n=17) входили пациенты, принимающие аторвастатин (статины), бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов). Пациенты подгруппы В (n=18) принимали бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов). Подгруппа Г (n=12) включала больных, принимавших этоксидол (антиоксидант) бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов).

Таблица 8 – Схема организации исследования

Показатель			Группы пациентов					
			Практически здоровые лица	Больные I группы		Больные II группы		
Общее количество пациентов			54	62		26		
Артериальная гипертензия	Степень:	1	-	1	1,61%	2	7,69%	
		2	-	24	38,71%	24	92,31%	
		3	-	37	59,68%	-	-	
	Стадия	1	-	-	-	14	53,85%	
		2	-	33	53,22%	12	46,15%	
		3	-	29	46,78%	-	-	
	Риск ССО	Низкий	-	-	-	-	2	7,69%
		Умеренный	-	2	3,23%	12	46,15%	
		Высокий	-	24	38,71%	12	46,15%	
		Очень высокий	-	36	58,06%	-	-	
Ишемическая болезнь сердца				56	90,32%	23	88,46%	
Стенокардия напряжения, функциональный класс	1 ф.к.	-	15	24,19%	4	15,38%		
	2 ф.к.	-	19	30,65%	-	-		
ХСН функциональный класс по NYHA	0 ФК	-	-	-	21	80,77%		
	I ФК	-	-	-	5	19,23%		
	II ФК	-	36	57,15%	-	-		
	III ФК	-	28	43,75%	-	-		

Продолжение Таблицы 8

Пол пациентов	Женщины - 48,1%, Мужчины - 51,9%	Женщины - 64,5%, Мужчины - 35,5%	Женщины – 57,7%, Мужчины – 42,3%
Средний возраст, лет	30,01±4,21	64,2 ± 6,98	65,54 ± 6,89
Средний вес, кг	67,18±9,59	66,54 ± 10,14	71,42 ± 8,45
Средний рост, см	173,87±7,91	169 ± 6,33	167,81 ± 5,73
Принимаемые лекарственные препараты	–	Бета-блокаторы и Блокаторы кальциевых каналов и/или Статины, Антиоксиданты	Бета-блокаторы, Блокаторы кальциевых каналов, Ингибиторы АПФ, Кудесан®
Схема отбора проб крови	Однократно	Однократно (через 3 дня от начала лечения)	Двукратно (на 2-ой и через 14 дней от начала лечения)
Объект исследования	Плазма крови	Плазма крови	Плазма крови
Анализируемое вещество	Общий CoQ10	Общий CoQ10, Убихинол, Убихинон	Общий CoQ10, Убихинол, Убихинон

Примечание: средние значения представлены в виде $Mean \pm S.E.$, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ССО-сердечно-сосудистые осложнения, ф.к. – функциональный класс, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент.

Таблица 9 – Лекарственные средства, принимаемые больными, включенными в исследование

№	Группа препаратов	Применяемые ЛС	Доза	Группа больных
1.	Статины	Аторвастатин	20 мг, 25 мг, 40 мг	I
2.	β-блокаторы	Бисопролол/ Метопролол	5 мг, 10 мг 50 мг	I, II
3.	Блокаторы кальциевых каналов	Амлодипин	5 мг, 10 мг	I
4.	Антиоксиданты	Этоксидол	50 мг	I
5.	иАПФ	Каптоприл/ Эналаприл	25 мг, 50 мг	I, II
6.	Антиоксиданты, антигипоксанты	Кудесан®	30мг	II

Для определения воздействия блокатора кальциевых каналов амлодипина на эндогенный уровень убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса проведен сравнительный статистический анализ концентрации в плазме крови больных, получавших аторвастатин (статины), бисопролол/метопролол (β-блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Б), и пациентов, получавших аторвастатин (статины), бисопролол / метопролол (β-блокаторы) (группа А). В данном случае контрольной группой для определения влияния препарата из группы блокаторов кальциевых каналов являлась группа А, так как в группу А входили больные, получавшие такую же терапию, как пациенты из тестируемой группы Б, за исключением амлодипина.

Для оценки влияния антиоксиданта этоксидола на эндогенный уровень убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса проводили сравнительный статистический анализ концентрации убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови больных, получавших этоксидол (антиоксидант), бисопролол / метопролол (β-блокаторы) и амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Г), а также пациентов, получавших бисопролол/метопролол (β-

блокаторы), совместно с амлодипином (блокатор кальциевых каналов) (группа В). Контрольной группой для определения влияния препарата из группы антиоксидантов была группа В, так как в группу В входили больные, получавшие такую же терапию, как пациенты из тестируемой группы Г, за исключением этоксида.

Для выявления воздействия аторвастатина (статины) на эндогенную концентрацию CoQ10 и его редокс-статус, сравнивали концентрацию убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови больных, получавших аторвастатин (статины), биспролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Б) и пациентов, получавших биспролол/метопролол (β -блокаторы) и амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа В). В данном случае контрольной группой являлась группа В, а тестируемой – группа Б, так как пациенты этой группы принимали те же ЛС, что и пациенты контрольной группы, а также аторвастатин.

Во вторую группу больных (II) входили пациенты со средним возрастом $65,21 \pm 6,98$ лет, страдающие от артериальной гипертензии (АГ) 1 (140–159/ 90-99 мм.рт. ст., у 7,69% больных) или 2 степени (160-179/100-109 мм.рт.ст., у 92,31% больных), 1 (у 53,85% больных) и 2 (у 46,15% больных) стадии с низким (у 7,69% больных), умеренным (у 46,15% больных) и высоким (у 46,15% больных) риском сердечно-сосудистых осложнений, ишемической болезни сердца (у 88,46% больных), стенокардии напряжения 1 функционального класса (у 15,38% больных) и ХСН 0 (у 80,77% больных) и I (у 19,23% больных) функциональных классов (по NYHA). Вторая группа по степени тяжести достоверно отличающиеся от больных I группы, где наблюдается более тяжелое течение заболеваний: у пациентов диагностированы II-III ФК ХСН, более высокий риск сердечно-сосудистых осложнений, а также чаще встречается стенокардия 1 и 2 функционального класса. В данную группы были включены пациенты. У больных этой группы изучали плазменную концентрацию убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса с целью определения влияния препарата Кудесан[®], содержащего коэнзим

Q10.

Для оценки влияния Кудесана® на плазменные концентрации убихинола, убихинона и CoQ10 больные из группы II были разделены на две подгруппы – контрольную (К) и тестируемую (Т). В контрольную группу вошли 12 больных в возрасте от 53 до 78 лет (средний возраст $66,07 \pm 7,14$ лет), которым была назначена стандартная терапия: ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), бета-адреноблокаторы и блокаторы кальциевых каналов (Таблица 8,10).

В тестируемую группу вошли 14 больных в возрасте от 52 до 75 лет (средний возраст $64,91 \pm 6,84$ лет), которым была назначена стандартная терапия (ингибиторы АПФ, бета-адреноблокаторы и блокаторы кальциевых каналов), 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 коэнзима Q10 составила 90 мг) с небольшим количеством воды во время утреннего приема пищи.

Кровь для определения концентрации общего CoQ10 у практически здоровых лиц отбирали однократно, у больных I группы для определения концентрации убихинола, убихинона и общего CoQ10 пробы крови отбирали однократно через 3 дня от начала лечения в стационаре, а у больных II группы для определения концентрации убихинола, убихинона и общего CoQ10 забор крови осуществляли дважды: на 2 день стандартной терапии в стационаре (исход) и 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 осуществляли утром до очередного приема Кудесана®.

Кровь для анализа отбирали следующим образом: в 8:00 утра натошак пациенту вводили одноразовый катетер в кубитальную вену и отбирали 5 мл крови в пробирку, содержащую ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием и хранили при -30°C до анализа.

Таблица 10 – Дизайн исследования

Группа пациентов	Подгруппа пациентов	Количество пациентов	Применяемые лекарственные средства (фармакологическая группа)	Тестируемая группа	Контрольная группа	Исследуемые лекарственные средства (фармакологическая группа)
1	А	15	Аторвастатин (статины), Бисопролол / Метопролол (β -блокаторы)	Б	+	–
	Б	17	Аторвастатин (статины), Бисопролол / Метопролол (β -блокаторы), Амлодипин (блокатор Са каналов)	+	А	Амлодипин (блокатор Са каналов)
				+	В	Аторвастатин (статины)
	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 (антиоксидант)	

Продолжение Таблицы 10

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	—	I	+	Амлодипин (блокатор Са каналов), Аторвастатин (статины), Этоксидол (антиоксидант)
				II	+	Кудесан [®]

Всего было проанализировано 396 проб, при этом: в 54 пробах, отобранных у практически здоровых лиц, определяли эндогенную концентрацию общего СоQ10, в 168 пробах больных первой группы изучали эндогенную концентрацию убихинола, убихинона, общего СоQ10 при приеме препаратов из различных групп, а также в 156 пробах больных второй группы анализировали концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 для оценки влияния Кудесана®. Количество выполненных исследований представлено в Таблице 11. Количественное определение убихинона и общего СоQ10 в плазме крови больных проводили методом ВЭЖХ с использованием разработанных методик (Глава 3), после чего методом вычитания рассчитывали содержание убихинола в плазме крови больных.

Таблица 11 – Количество выполненных исследований по группам пациентов

Группа пациентов	Подгруппа пациентов	Количество проанализированных проб		
		Методом ВЭЖХ		Расчетным методом
		Общий СоQ10	Убихинон	Убихинол
I группа больных	А	15	15	15
	Б	17	17	17
	В	18	18	18
	Г	12	12	12
II группа больных	Т	28	28	28
	К	24	24	24
Практически здоровые лица	-	54	-	-
Общее количество проанализированных проб		168	114	114
		396		

По полученным индивидуальным значениям концентрации убихинола и убихинона в плазме крови больных рассчитывали индивидуальные значения их плазменных уровней в % от содержания общего СоQ10.

Процентное содержание убихинола в плазме крови больных рассчитывали по формуле

$$\text{CoQ10H2 (\%)} = \frac{c(\text{CoQ10H2}) * 100\%}{c(\text{CoQ10общий})}, \quad (1.1)$$

где

CoQ10H2% – индивидуальное значение плазменного уровня убихинола от содержания общего CoQ10 (%),

c(CoQ10H2) – индивидуальное значение концентрации убихинола в плазме крови больного (мкг/мл),

c(CoQ10общий) – индивидуальное значение концентрации общего коэнзима Q10 в плазме крови больного (мкг/мл).

Процентное содержание убихинона в плазме крови больных рассчитывали по формуле

$$\text{CoQ10 (\%)} = \frac{c(\text{CoQ10}) * 100\%}{c(\text{CoQ10общий})}, \quad (1.2)$$

где

CoQ10% – индивидуальное значение плазменного уровня убихинона от содержания общего CoQ10 (%),

c(CoQ10) – индивидуальное значение концентрации убихинона в плазме крови больного (мкг/мл),

c(CoQ10общий) – индивидуальное значение концентрации общего коэнзима Q10 в плазме крови больного (мкг/мл).

Значения редокс-статуса CoQ10 в плазме крови больных рассчитывали двумя способами: как отношение индивидуальных значений концентрации убихинола к концентрации убихинона (в мкг/мл), а также как соотношение индивидуальных уровней убихинола и убихинона (в % от общего CoQ10).

Редокс-статус, как отношение значений концентрации убихинола к концентрации убихинона, рассчитывали по формуле

$$\text{CoQ10redox (I)} = \frac{c(\text{CoQ10H2})}{c(\text{CoQ10})}, \quad (1.3)$$

где

CoQ10redox (I) – редокс-статус CoQ10,

$c(\text{CoQ10H}_2)$ – индивидуальное значение концентрации убихинола в плазме крови больного (мкг/мл),

$c(\text{CoQ10})$ – индивидуальное значение концентрации убихинона в плазме крови больного (мкг/мл),

Редокс-статус, как соотношение индивидуальных уровней убихинона и убихинола, рассчитывали по формуле

$$\text{CoQ10redox (II)} = \frac{\text{CoQ10H}_2\%}{\text{CoQ10\%}}, \quad (1.4)$$

где

CoQ10redox (II) – редокс-статус CoQ10,

CoQ10H2% – индивидуальное значение плазменного уровня убихинола от содержания общего CoQ10 (%),

CoQ10% – индивидуальное значение плазменного уровня убихинона от содержания общего CoQ10 (%).

2.5. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась при помощи программы Statistica 6.0. Для статистической обработки данных были использованы методы описательной статистики. Для каждой группы данных рассчитывали следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (*Mean*), стандартное отклонение среднего результата (*S.D.*), стандартная ошибка (*S.E.*), коэффициент вариации (*C.V.*), верхняя и нижняя границы 95% доверительного интервала среднего (*D.I.*).

Также проводили сравнительный анализ средних значений различных выборок. Для этого сначала проводили тест Левена на гомогенность дисперсий, чтобы в выбранных группах определить уровень значимости различий дисперсии.

Если $p > 0,05$, то различие дисперсий считали незначимым. Соответствие нормальному распределению полученных данных проверяли при помощи непараметрического теста Колмогорова-Смирнова. Распределение считалось нормальным при условии $p > 0,10$. При условии соблюдения нормального распределения полученных данных сравнения выборок проводились при помощи t-критерия Стьюдента как для независимых групп, так и для парных исследований с применением коррекции Уэлча при необходимости. Если критическое значение t-критерия Стьюдента было больше или равнялось рассчитанному значению, то разница между группами оценивалась как статистически значимая. Рассчитывался 95% доверительный интервал среднего для концентрации убихинола, убихинона и CoQ10. При условии отсутствия нормального распределения между выборками использовали непараметрический тест Манна-Уитни для оценки статистически значимых различий между группами. Избранным уровнем статистической значимости определили $p=0,05$. Достоверность различий увеличивалась с уменьшением коэффициента U' .

При сравнении трёх и более независимых групп для выявления статистически значимых различий средних использовали метод однофакторного дисперсионного анализа: ANOVA, так как t-критерий предназначен только для парных сравнений, а для множественных необходимо вносить поправки, вследствие этого высока вероятность ошибки первого рода. Для выяснения возможности использования для полученных экспериментальных данных этого метода и однофакторного F-критерия проверяли выполнения трёх основных условий: нормального распределения, одинаковой дисперсии данных, также факта, что полученные данные независимые и случайные. При обнаружении статистически значимых различий проводили апостериорные сравнения при помощи критерия Тьюки-Крамера. Данный критерий позволяет сравнить все пары групп одновременно. Также, использовали статистический критерий Бартлетта, проверяющий равенство дисперсий в выборках.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УБИХИНОНА И УБИХИНОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Разработка методики количественного определения убихинона и убихинола и общего CoQ10 в плазме крови проводилась первоначально при помощи метода ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. Для разработки методики количественного определения изучаемых эндогенных веществ в плазме крови осуществляли подбор условий хроматографического разделения убихинона и убихинола, условий извлечения анализируемого вещества из плазмы крови и выбор методики количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10.

3.1. Разработка методики количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ

Подбор условий хроматографического разделения убихинона и убихинола представлен в Таблице 12.

Так как убихинон является липофильным веществом, была использована колонка Eclipse XDB-C18 и первым в качестве подвижной фазы был опробован метанол. При использовании данного элюента обнаружение убихинона и его разделение с убихинолом оказалось невозможным. При добавлении в подвижную фазу 0.1% муравьиной кислоты результат остался отрицательным.

После этого, в качестве подвижной фазы, исходя из литературных данных, был выбран 100% этанол. При использовании 100% этанола время удерживания убихинона составило 42,15 минут, а убихинола, в свою очередь, 24,23, что сделало бы анализ слишком длительным (Рисунок 6).

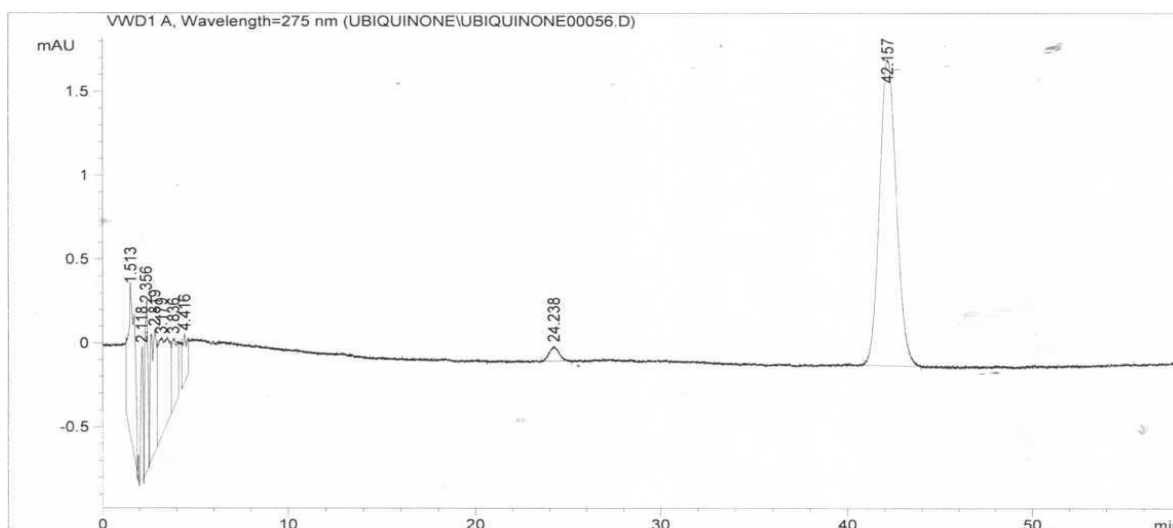


Рисунок 6 - Хроматограмма разделения убихинола и убихинона: ПФ 100% этанол, скорость потока 0,7 мл/мин, длина волны 275 нм, колонка Eclipse XDB-C18

Следовательно, подвижная фаза требовала модификации. При использовании в качестве подвижной фазы смеси этанол: ацетонитрил (80:20) время удерживания убихинона увеличивалось до 47,32 минут, а убихинола до 30,19, соответственно (Рисунок 7).

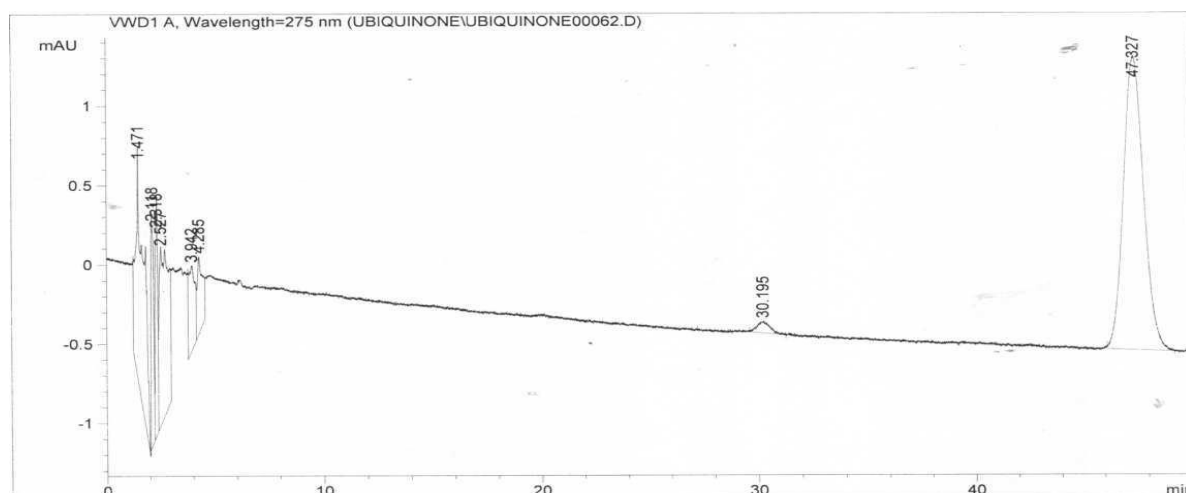


Рисунок 7 - Хроматограмма убихинола и убихинона: ПФ смесь этанол: ацетонитрил (80:20), скорость потока 0,7 мл/мин, длина волны 275 нм, колонка Eclipse XDB-C18

При использовании в качестве подвижной фазы смеси этанол: ацетонитрил (60:40) время удерживания убихинона увеличивалось до 61,24 минуты, а убихинол не обнаруживался (Рисунок 8).

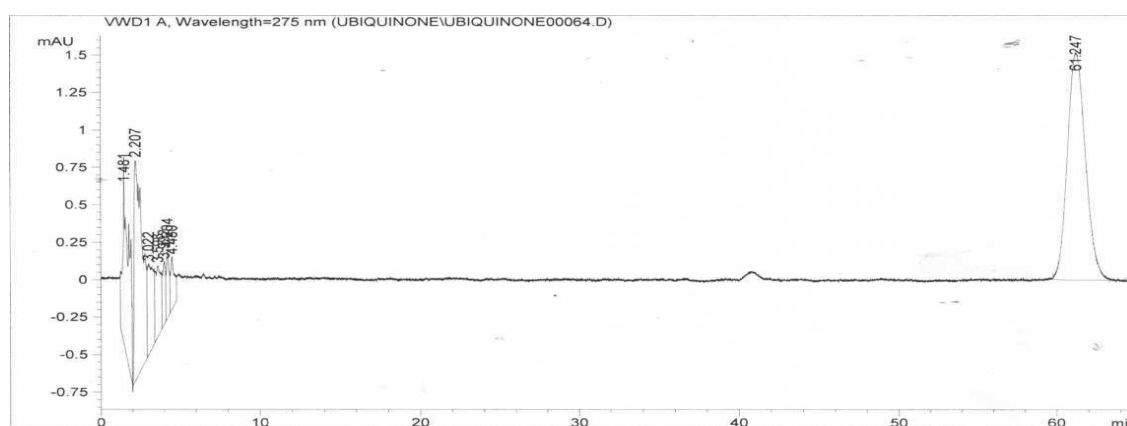


Рисунок 8 - Хроматограмма разделения убихинола и убихинона: ПФ смесь этанол: ацетонитрил (60:40), скорость потока 0,7 мл/мин, длина волны 275 нм, колонка Eclipse XDB-C18

Так как изменения состава подвижных фаз не привели к более быстрому элюированию убихинона и убихинола, скорость потока была увеличена до 0,8 мл/мин. При увеличении скорости потока до 0,8 мл/мин время удерживания убихинона составило 22,7 минут, а убихинола - 13,51 при использовании в качестве подвижной фазы 100% этанола (Рисунок 9). Поскольку в данных условиях хроматографирования время анализа составляло не менее 30 минут, были предприняты попытки подобрать другие условия для сокращения времени анализа.

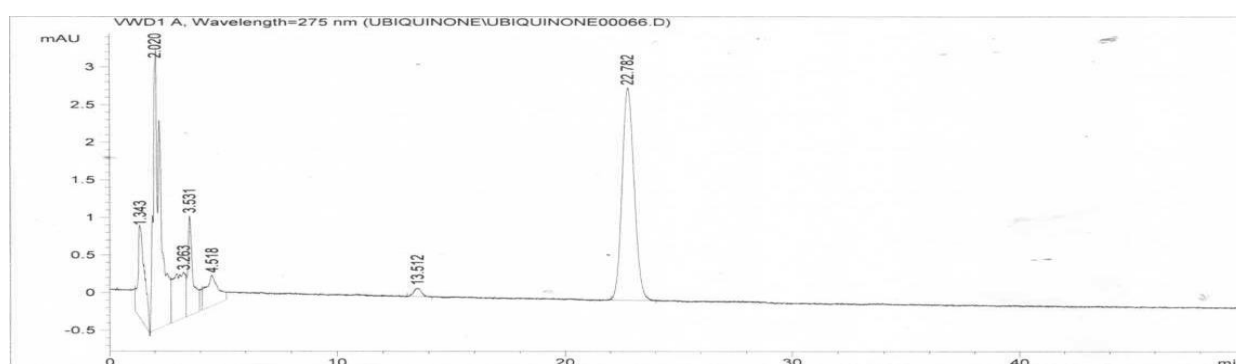


Рисунок 9 - Хроматограмма разделения убихинола и убихинона: ПФ 100% этанол, скорость потока 0,8 мл/мин, длина волны 275нм, колонка Eclipse XDB-C18

При использовании в качестве подвижной фазы смеси этанол: изопропанол (95:5) время удерживания убихинона составило 23,73 минуты, а убихинола - 14,26 (Рисунок 10). То есть время удерживания веществ практически не поменялось.

Поэтому, было принято решение добавить в подвижную фазу еще 5% изопропанола.

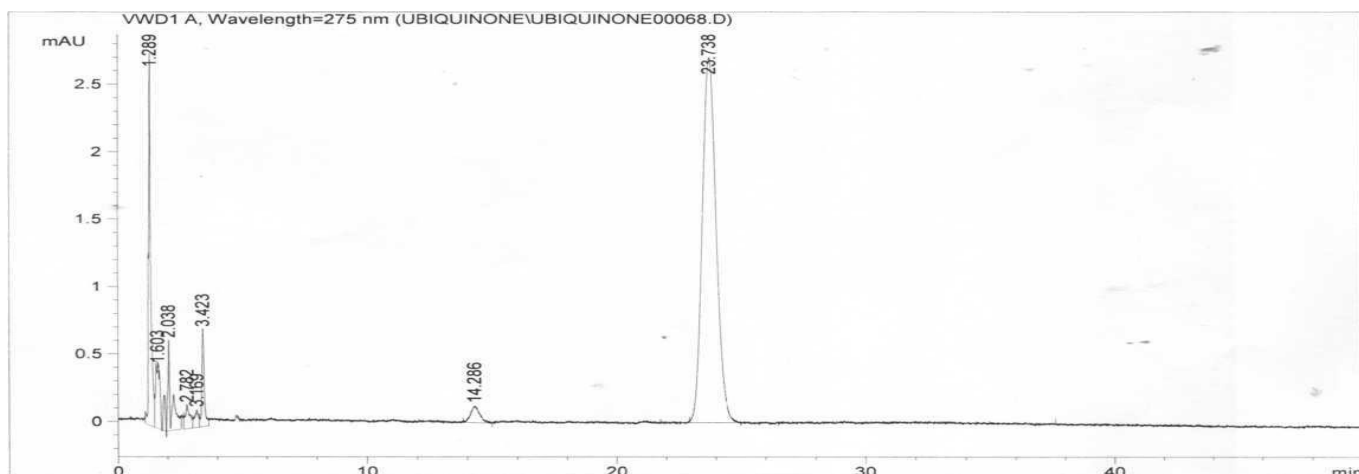


Рисунок 10 - Хроматограмма разделения убихинола и убихинона: ПФ смесь этанол:изопропанол (95:5), скорость потока 0,8 мл/мин, длина волны 275 нм, колонка Eclipse XDB-C18

При использовании в качестве подвижной фазы смеси этанол: изопропанол (90:10) время удерживания убихинона сократилось до 17,16 и 8,2 минут (Рисунок 11).

Следующей модификацией хроматографических условий стало изменение температуры до 40°C. Время удерживания убихинона (12,97 мин), и убихинола (8,2 мин) оказалось оптимальным.

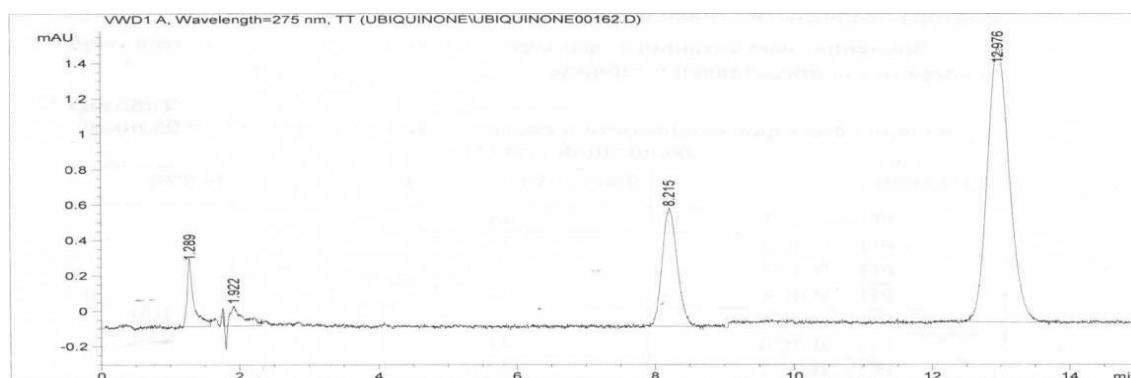


Рисунок 11 - Хроматограмма разделения убихинона и убихинола: ПФ смесь этанол:изопропанол (90:10), скорость потока 0,8 мл/мин, смена длины волны с 290 нм на 275 нм, колонка Eclipse XDB-C18

Исходя из полученных данных, наилучшее разделение убихинола и убихинона наблюдалось при использовании подвижной фазы этанол: изопропанол (90:10). Другие исследования ПФ оказались непригодными для дальнейшего исследования, поскольку вещества имели либо слишком большое время удерживания и нечеткие пики, либо не выходили из колонки вообще. Таким образом, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения убихинона и убихинола. При этом использовали режим с переключением длины волны с 275 нм для определения убихинона на 290 нм для определения убихинола, поскольку максимальное поглощение в данной области [22].

Был использован метод обращеннофазовой жидкостной хроматографии в изократическом режиме с колонкой Eclipse C18 (150×4,6; 5 мкм) при температуре 40 °С, длина волны $\lambda=275$ нм (убихинон), $\lambda=290$ нм (убихинол), скорость потока составила 0,8 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовалась смесь этанол: пропанол-2 (90:10). Время удерживания убихинона составило $12,9 \pm 0,2$ минут, убихинола – $8,2 \pm 0,2$ минут (Таблица 13).

Таблица 12 - Подбор условий хроматографического разделения для убихинона и убихинола

Подвижная фаза	Скорость потока мл/мин	Концентрация убихинона и убихинола, мкг/мл	Температура термостата, °С	Время удерживания, мин
100% метанол	0,7	20	37	- -
100% метанол+ 0.1% муравьиная кислота	0,7	20	37	- -
100% этанол	0,7	20	37	42,2 (Убихинон) 24,2 (Убихинол)

Продолжение Таблицы 12

100% этанол+ 0.1% муравьиная кислота	0,7	20	37	- -
80:20 этанол: ацетонитрил	0,7	20	37	47,3 (Убихинон) 30,2 (Убихинол)
60:40 этанол: ацетонитрил	0,7	20	37	61,2 (Убихинон) -
100 % этанол	0,8	20	37	22,7 (Убихинон) 13,5 (Убихинол)
95:5 этанол: изопропанол	0,8	20	37	23,7 (Убихинон) 14,3 (Убихинол)
95:5 этанол: изопропанол	0,8	20	37	17,6 (Убихинон) 8,4 (Убихинол)
90:10 этанол: Изопропанол	0,8	20	40	12,9 (Убихинон) 8,2 (Убихинол)

Таблица 13 - Условия хроматографического разделения

Параметр	Условия
Режим элюирования	Изократический
ПФ	Этанол:изопропанол (90:10)
Скорость потока, мл/мин	0,8
t колонки	40 °С
Объем вводимой пробы, мкл	5
Время удерживания, мин	Для убихинона 12,9
	Для убихинола 8,2
Общее время анализа, мин	15

Экстракция убихинола и убихинона из плазмы крови. Для извлечения убихинола и убихинона из плазмы крови используются методы жидкостной экстракции, метод осаждения белков крови, также применяется метод твердофазной экстракции. В данном исследовании пробоподготовку образцов

плазмы крови проводили методом жидкость-жидкостной экстракции. Подбор оптимальных условий, обеспечивающих максимальное извлечение убихинона, включал в себя выбор экстрагента, объем экстрагента и соотношение с объемом аликвоты плазмы, рН среды, кратность экстракции.

В качестве экстрагентов использовали смесь этилового спирта и гексана в соотношении 1:1 или диэтиловый эфир (Таблица 14).

Таблица 14 - Степень экстракции убихинона органическими растворителями

Экстрагент	Соотношение плазма:экстрагент по объёму	рН среды	% экстракции
Этиловый спирт: гексан 1:1 (об.)	1:5	Нейтральный	35
Этиловый спирт: гексан 1:1 (об.)	1:3,5	Нейтральный	28
Диэтиловый эфир	1:5	Нейтральный	84

Наилучшая степень извлечения убихинона наблюдалась при экстракции диэтиловым эфиром.

После такой пробоподготовки убихинол практически не определялся. Добавление различных стабилизаторов, например, аскорбиновой кислоты, ВНТ (бутилгидрокситолуол) - не привели к увеличению пика убихинола. Поэтому рассматривали другие методы пробоподготовки, такие как: осаждения белков при помощи хлористоводородной кислоты или ацетонитрила. Однако в данном случае степень извлечения аналитов из биологической матрицы была близкой к нулю, в связи с чем был сделан выбор в пользу метода жидкость-жидкостной экстракции с использованием диэтилового эфира. Однако данным методом возможно определение убихинона или общего CoQ10.

Таким образом, оптимальной для определения убихинона оказалась пробоподготовка по следующей схеме. К аликвоте плазмы крови (1 мл), помещённой в тefлоновую центрифужную пробирку с навинчивающейся крышкой, добавляли 5 мл диэтилового эфира. Смесь тщательно встряхивали в

течение 10 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 об/мин на протяжении 10 минут. Отбирали органический слой в коническую колбу и упаривали под вакуумом досуха при температуре 37°C, далее сухой остаток растворяли в 250 мкл этанола, переносили в стеклянную виалу и помещали в автоматический пробоотборник хроматографа.

Количественное определение убихинона в плазме крови. Для количественного определения убихинона применяли метод абсолютной калибровки с добавлением стандартного образца убихинона.

С целью оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика (Рисунок 13). Для этой цели готовили серию калибровочных образцов, состоящих из интактной плазмы с добавлением стандартного раствора убихинона. Для каждого калибровочного образца отбирали по 900 мкл интактной плазмы крови, к которым добавляли по 100 мкл раствора убихинона с концентрациями 100 мкг/мл; 50 мкг/мл; 25 мкг/мл; 10 мкг/мл; 7,5 мкг/мл; 5 мкг/мл (Таблица 15). Пробоподготовку проводили, как описано выше.

Таблица 15 - Расчет концентраций добавок стандартного раствора убихинона в плазму крови в калибровочных пробах

Объем плазмы, мкл	Объем раствора убихинона, мкл	Концентрация стандартного раствора убихинона, мкг/мл	Концентрация убихинона в плазме, мкг/мл
900	100	100,00	10,00
		50,00	5,00
		25,00	2,50
		10,00	1,00
		7,50	0,75
		5,00	0,50

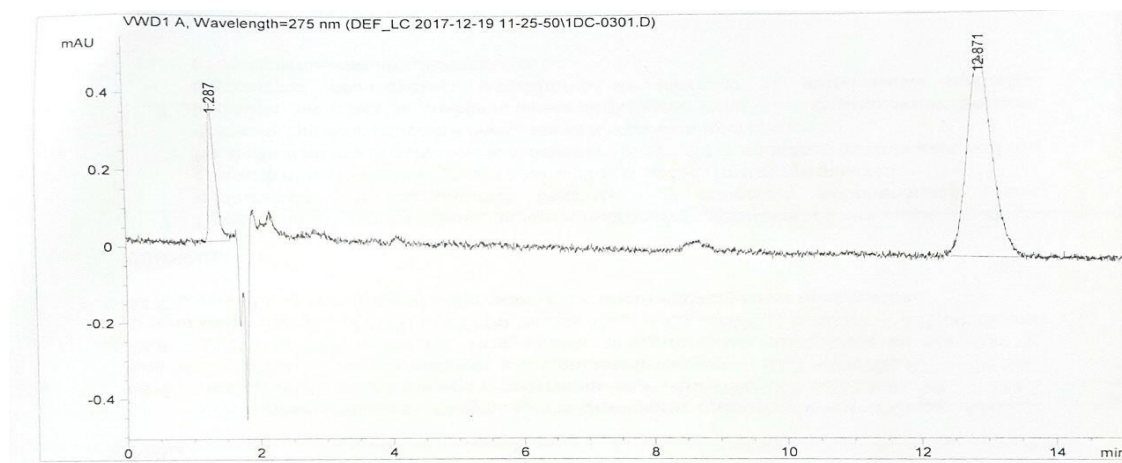


Рисунок 12 - Хроматограмма калибровочной пробы убихинона с концентрацией 1,0 мкг/мл

Валидация методики определения убихинона в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ. Валидацию проводили по следующим параметрам: линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения.

Для подтверждения линейности методики был построен калибровочный график зависимости площади пика убихинона от его концентрации (Рисунок 13).

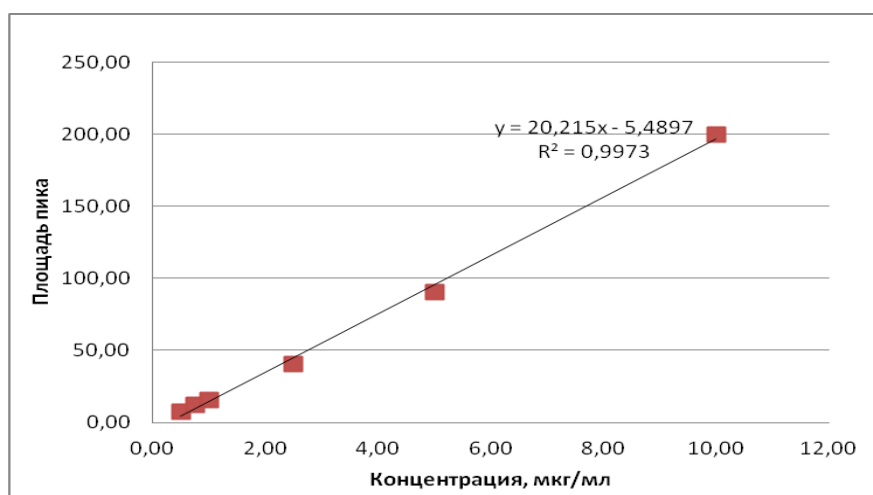


Рисунок 13 - Калибровочный график убихинона

Представленные данные свидетельствуют о том, что коэффициент детерминации (R^2) составил 0,997, соответственно, коэффициент корреляции (r) был равен 0,998, что соответствует критерию приемлемости для биоаналитических методик ($r > 0,99$).

Правильность характеризуется отклонением измеренного значения

концентрации от истинного. В соответствии с критерием приемлемости правильной считается та хроматографическая система, истинные значения которой лежат внутри доверительных интервалов, соответствующих средним результатам анализов, которые получены по методике (от 90 до 110%).

Прецизионность характеризуется степенью близости результатов для измерений, которые были выполнены в течение небольшого промежутка времени в одних и тех же условиях. Правильность и прецизионность оценивались на 3 уровнях концентраций: 0,5 мкг/мл, 0,75 мкг/мл; 5 мкг/мл. Было выполнено 3 повторных измерения для данных 3 аналитических концентраций (Таблица 16). Относительная ошибка среди всех повторностей составила не более 10,85%, а среднеквадратичное отклонение (RSD) – 14,82%.

Из данных, приведенных в таблице, следует, что относительная погрешность среднего результата не превышала 13,76% на концентрации 0,5 мкг/мл и 5% на остальных точках при оценке внутрисуточной точности, а также не превышала 14,06% на концентрации 0,5 мкг/мл и 13,97% на остальных концентрациях при оценке междневной точности. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляют 0,075; 0,024; 0,15 соответственно для концентрации убихинона 0,5; 0,75; 5,0 плазмы крови. Истинное содержание убихинона в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика свободна от систематических ошибок. Нижний предел количественного определения (НПКО) – наименьшая концентрация аналита в образце, которая поддается количественному определению с приемлемой точностью и прецизионностью. НПКО для убихинона составил 0,5 мкг/мл.

Таким образом, данная методика может применяться для количественного определения общего CoQ10 у практически здоровых лиц. Для определения убихинола, убихинона и общего CoQ10 у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями необходимо разработать более чувствительный метод – с применением метода ВЭЖХ-МС/МС.

Таблица 16 - Метрологические характеристики количественного определения убихинона в плазме крови

μ , мкг/мл	Найдено	F	\bar{x}	S^2	S (n=6)	S σ	P%	$t_{\text{табл.}}$	$t_{\text{выч}}$	Δx	$\Delta \bar{x}$	ξ , %	$\bar{\xi}$, %	\bar{x} , %	S σ , %
Внутридневная															
0,5	0,48	5	0,545	0,00511	0,0715	0,02918	95	2,57	1,54	0,1837	0,0750	33,71	13,76	15,00	5,35
	0,56														
	0,5														
	0,68														
	0,53														
	0,52														
0,75	0,748	5	0,769	0,00055	0,02334	0,00953	95	2,57	1,98	0,0599	0,0245	7,80	3,26	1,22	1,24
	0,789														
	0,765														
	0,74														
	0,77														
	0,801														
5,0	5,366	5	5,148	0,02117	0,1455	0,05940	95	2,57	2,49	0,3739	0,1527	7,264	2,965	3,053	1,15
	4,998														
	5,238														
	4,987														
	5,18														
	5,12														

Продолжение Таблицы 16

Междневная															
0,5	0,689	5	0,563	0,00569	0,0754	0,03079	95	2,57	2,04	0,1938	0,0791	34,45	14,06	15,83	5,47
	0,62														
	0,521														
	0,536														
	0,512														
	0,498														
0,75	0,893	5	0,756	0,00529	0,0727	0,02971	95	2,57	0,21	0,1870	0,0763	24,73	10,10	10,17	3,93
	0,77														
	0,741														
	0,738														
	0,69														
	0,705														
1,0	5,285	5	4,976	0,43898	0,6626	0,27049	95	2,57	0,09	1,7028	0,692	34,22	13,97	13,90	5,44
	5,978														
	4,78														
	5,236														
	4,437														
	4,14														

Примечание: μ – истинное значение измеряемой величины, f - число степеней свободы, S - стандартное отклонение, S^2 - дисперсия, S_{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 и среднего результата; $\bar{\xi}$ - относительная ошибка среднего результата, $\bar{x}\%$ - отклонение от среднего результата, $S_{\sigma}, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата

3.2. Разработка методики количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

При разработке метода ВЭЖХ-МС/МС были изучены следующие компоненты подвижной фазы Б: ацетонитрил, метанол, этилацетат. Изначально в качестве основы для приготовления элюента Б использовался ацетонитрил. Однако стало очевидно, что ацетонитрил плохо элюирует исследуемые вещества, что приводит к большим значениям RT и увеличивает время анализа. При использовании метанола как основы элюента Б удалось добиться более быстрого элюирования убихинола и убихинона, а также снизить размывание пиков. Тем не менее, в данном случае время анализа все равно составляло от 20 минут до получаса, что неудобно при рутинном использовании методики. Введение в состав элюента Б этилацетата увеличило элюирующую силу, причем при использовании состава метанол + 20% этилацетат с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака убихинол и убихинон элюировались слишком быстро и разрешение было наименьшим среди испытанных составов элюента Б. Оптимальной оказалась добавка 10% этилацетата.

Представленный состав элюента Б был подобран экспериментально, и различные его варианты, включая хроматографические характеристики, представлены в Таблице 17, Рисунке 14, 15, 16.

Таблица 17 – Хроматографические характеристики при подборе состава элюента Б для оптимального хроматографического разделения убихинона и убихинола

	Время удерживания RT, мин	Коэффициент асимметрии пика на 10% высоты TF 10%	Число теоретических тарелок NTP(USP)	Ширина пика (USP), мин
Метанол с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака без градиента потока ¹⁾				
Убихинол	13,11	1,227	15515	0,421
Убихинон	19,91	1,018	7070	0,947

Продолжение Таблицы 17

Метанол с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака с градиентом потока ²⁾				
Убихинол	11,85	1,040	10254	0,468
Убихион	17,50	1,031	6874	0,845
Метанол + 20% этилацетат с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака ²⁾				
Убихинол	7,27	1,413	19397	0,209
Убихион	8,44	1,520	12062	0,308
Метанол + 10% этил ацетат с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака ²⁾				
Убихинол	8,90	1,295	11008	0,339
Убихион	11,41	1.203	9394	0,471
Метанол + 10% этил ацетат с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака ³⁾				
Убихинол	8,03	1,158	9711	0,326
Убихион	10,59	1,173	9471	0,435

Примечание: ¹⁾ – Был использован следующий градиентный режим 0 до 1 мин – 20%, от 1 до 4 мин – 20% -100%, от 4 до 38 мин – 100% , от 38 до 39 мин – 100 - 20% Общая скорость потока составила 1 мл/мин, ²⁾ – Был использован следующий градиентный режим 0 до 1 мин – 20%, начальная скорость потока составляла 1 мл/мин, от 1 до 4 мин – 20% до 100%, от 4 до 38 мин – 100% , от 5 до 6 мин общая скорость потока от 1 до 1,2 мл/мин, от 6 до 35 мин общая скорость потока составляла 1,2 мл/мин, от 35 до 36 мин общая скорость потока от 1,2 до 1 мл/мин, от 38 до 39 мин – 100 - 20%, ³⁾ –Использованный градиентный режим представлен в Таблице 18.

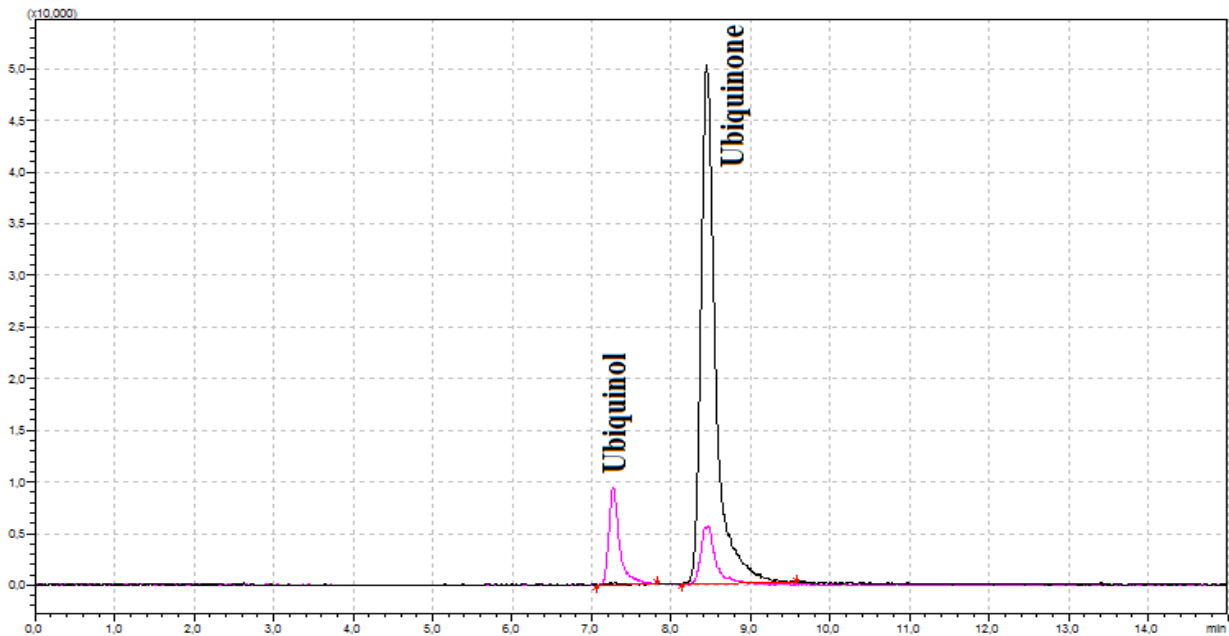


Рисунок 14 - Хроматограмма стандартных растворов убихинона и убихинола с использованием в качестве элюента Б метанола + 20% этилацетата с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака

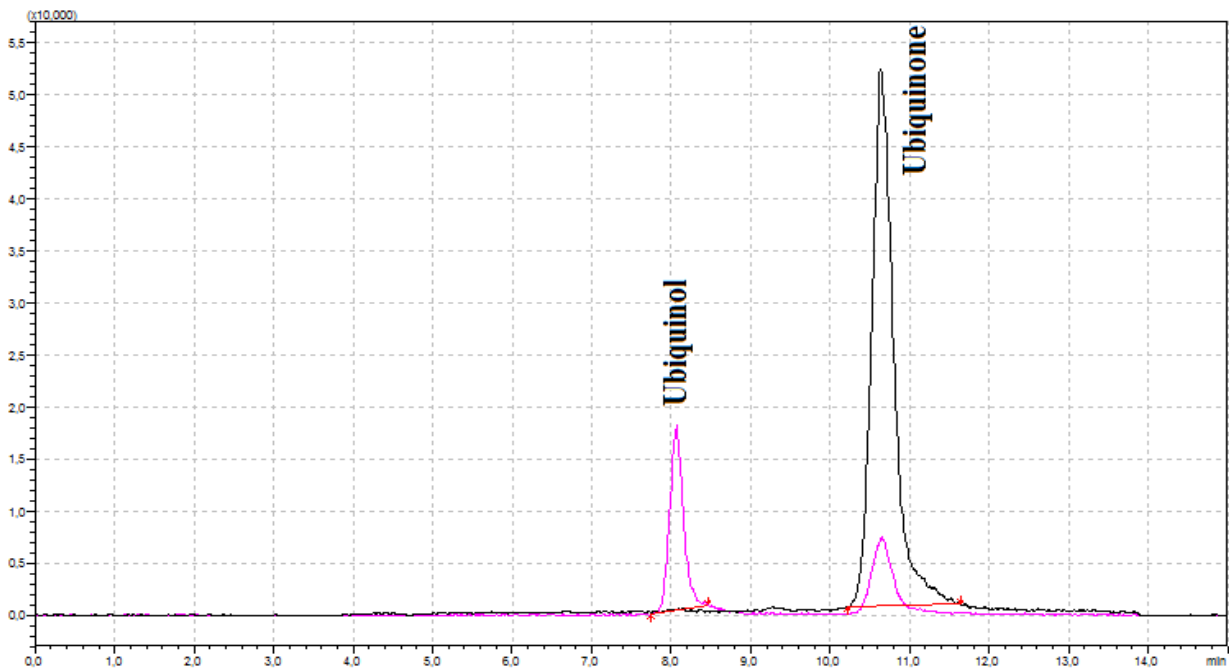


Рисунок 15 - Хроматограмма стандартных растворов убихинола и убихинона с использованием в качестве элюента Б метанола + 10% этилацетата с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака

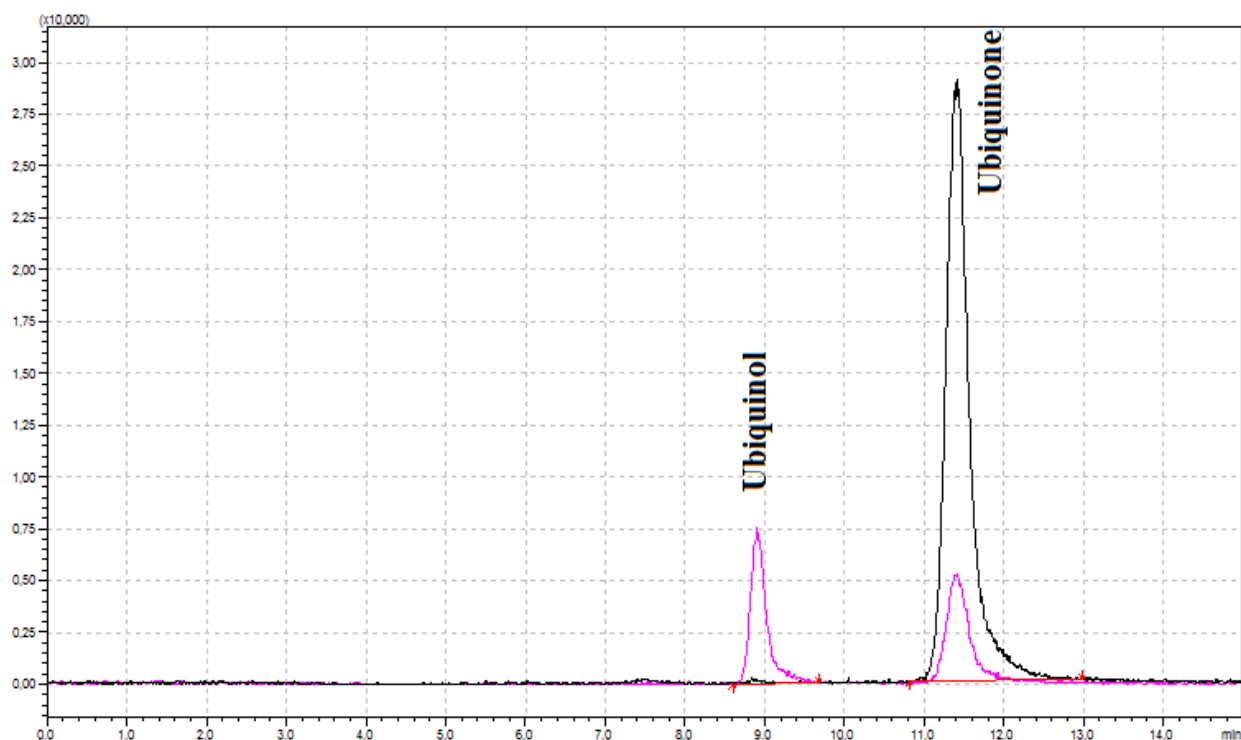


Рисунок 16 - Хроматограмма стандартных растворов убихинола и убихинона с использованием в качестве элюента Б метанола + 10% этилацетата с 0.1% (об.) муравьиной кислоты и 0.04% (об.) концентрированного (25%) раствора аммиака

Стоит иметь в виду, что вместе с убихинолом и убихиноном соэлюируются другие липофильные компоненты плазмы крови, в частности, фосфолипиды. Содержание фосфолипидов в плазме крови достаточно высоко, и избавиться от них на этапе пробоподготовки при анализе убихинона и убихинола довольно трудно, так как все эти вещества обладают высокой липофильностью и хорошо экстрагируются органическими растворителями. Известно, что они оказывают сильное влияние на образование ионов-предшественников соэлюируемых веществ в ионном источнике в ионизации электрораспылением, и чаще всего фосфолипиды подавляют ионизацию других веществ, то есть может наблюдаться негативный эффект матрицы. При рутинном анализе большого числа проб фосфолипиды могут накапливаться на сорбенте, что приводит к большой вариабельности эффекта матрицы в зависимости от уровня фона фосфолипидов. С целью исключения указанного явления этап подачи чистого элюента Б в разработанном градиентном режиме составил 10 минут при дополнительном увеличении скорости потока. В

этих условиях удаётся не только добиться желаемых параметров разделения убихинона и убихинола, но и "отмыть" сорбент от избыточного количества сопутствующих липофильных веществ.

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. Градиент состава и скорости потока подвижной фазы представлен в Таблице 18. Объём вкола составил 5 мкл [178].

Таблица 18 - Градиент состава и скорости потока подвижной фазы

Время анализа, мин.	Объемная доля элюента В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0→1	20	1
1→3	20→100	1
3→13	100	1
4→5	100	1→1,2
5→13	100	1,2
13→14	100→20	1,2→1
15	20	1

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, убихинола – $8,0 \pm 0,2$ мин, а токоферола ацетата $5,15 \pm 0,2$ мин соответственно.

В качестве внутреннего стандарта был выбран токоферола ацетат. Во-первых, токоферола ацетат сопоставим с CoQ10 по гидрофобности и степени извлечения. Во-вторых, он хорошо хроматографически разделяется с убихиноном и убихинолом.

При ионизации был использован метод электрораспыления ESI в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме MRM

(мониторинг множественных реакций), условия подбирали экспериментально. Ионы-предшественники соответствовали [179]: 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 [180, 181]. Ионы-предшественники $[M + H]^+$ обладали более низкой интенсивностью в масс-спектре по сравнению с ионами $[M + NH_4]^+$. В связи с этим, для высокой воспроизводимости результатов необходимо было приготовить подвижную фазу с добавлением формиата аммония. У внутреннего стандарта, токоферол ацетата, ион-предшественник соответствовал протонированному молекулярному иону $[M+H]^+$ с 473,25 m/z , дочерние ионы: 207,00 m/z и 165,10 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 токоферол ацетата. Температура линии десольватации составила 200 °С, а температура нагревательного блока - 400 °С. Условия масс-спектрометрического разделения изучаемых веществ представлены в Таблице 19.

Таблица 19 - Условия детектирования аналитов методом ВЭЖХ-МС/МС

Параметр	Значение
Режим ионизации	ESI
Поток газа-распылителя	20 л/мин
Давление осушающего газа	3 л/мин
Напряжение на источнике ионизации	3000 В (убихинон, убихинол)
	4500 В (токоферол ацетат)
Температура линии десольватации	200 °С
Температура нагревательного блока	400 °С
Режим регистрации ионов	Положительный
MRM для убихинона	880,7 m/z → 197,1 m/z
MRM для убихинола	882,7 m/z → 197,1 m/z
MRM для токоферол ацетата	473,25 m/z → 207,00 m/z
	473,25 m/z → 165,10 m/z

Ключевой проблемой в разработке методики являлась невозможность приобретения стандартного образца человеческой плазмы без убихинона для определения селективности, а также для калибровочных проб образцов контроля качества. Известны различные подходы к измерению эндогенных веществ в биологических матрицах [182], включая компенсацию фона, метод стандартных добавок и суррогатные матрицы. Был выбран первый метод, так как предполагается, что метод вычитания фона является наиболее подходящим для рутинных биоаналитических анализов, в то время как в случае метода стандартных добавок для каждой пробы должна быть подготовлена его собственная калибровка, что влечет за собой увеличение времени анализа. Использование третьего подхода требует выбора подходящей суррогатной матрицы и проведения долгосрочных и подробных исследований степеней извлечения и влияния матрицы.

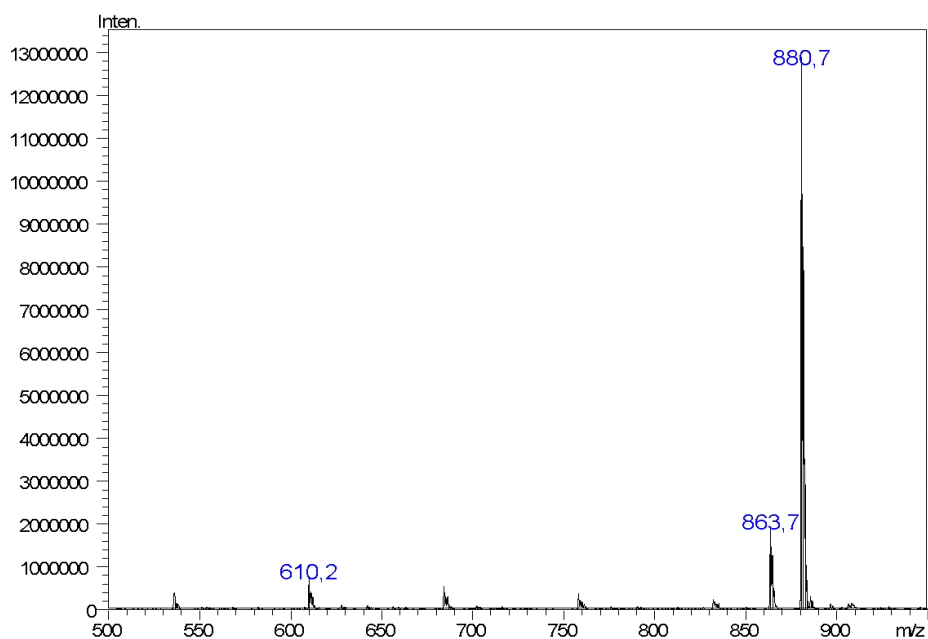
Селективность. При применении выбранного подхода не представляется возможным определить селективность методики по классической схеме, сравнивая отклик аналита на хроматограммах холостой матрицы и проб контроля качества (КК). Таким образом, селективность может быть обеспечена только путем оптимизации параметров детектирования и разработки эффективной методики хроматографического разделения.

Анализируемые вещества имеют очень близкие значения молекулярной массы (разница составляет 2 ДА), что обуславливает возможность их перекрестного детектирования за счет естественного изотопного распределения (Рисунок 17а, 17б). Более того, сходства двух структур ведут к сходству фрагментации их молекулярных ионов. Наиболее интенсивные значения m/z в масс-спектрах фрагментных ионов идентичны (Рисунок 18а, 18б). Таким образом, даже режим MRM не может в данном случае обеспечить высокую селективность.

Чтобы избежать наложения пиков и перекрестного обнаружения аналитов, большое внимание уделялось выбору оптимальных условий хроматографического разделения (Таблица 19) [183]. Приготовление элюента Б на основе метанола позволяет достичь хорошего разрешения, эффективности и приемлемой симметрии

пиков. Чтобы сократить время анализа, целесообразно добавить в элюент этилацетат, и оптимальное соотношение метанол:этилацетат составляет 9:1. Таким образом, путём оптимизации хроматографического разделения удалось добиться требуемой селективности.

а)



б)

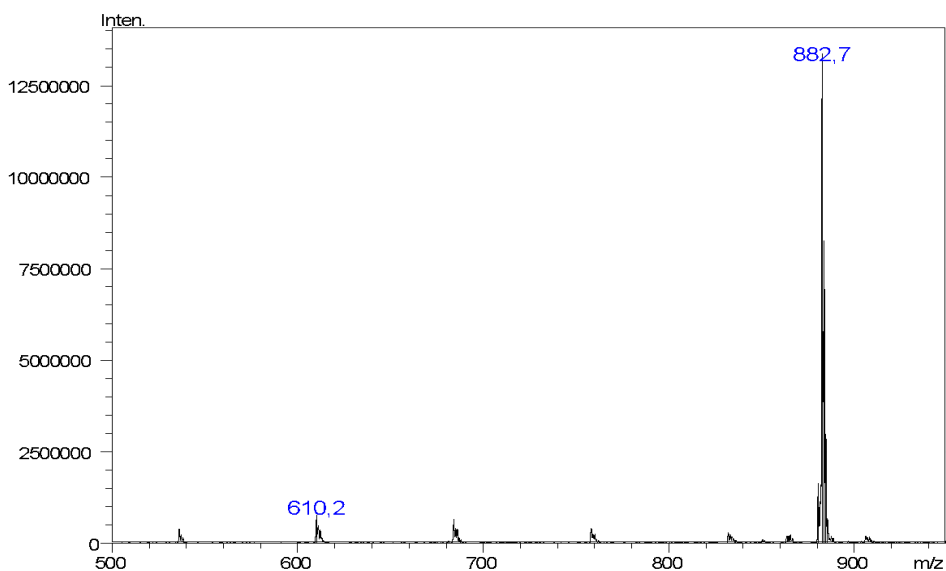
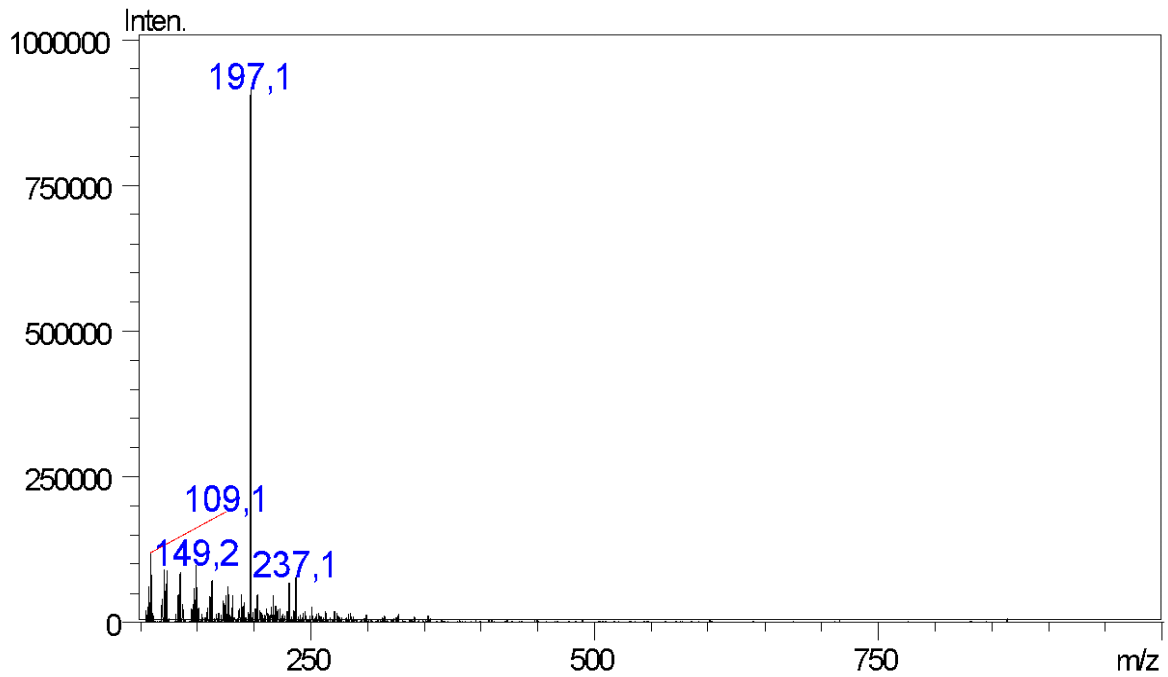


Рисунок 17 - Полный ионный ток масс-спектра убихинона (а) и убихинола (б)

a)



б)

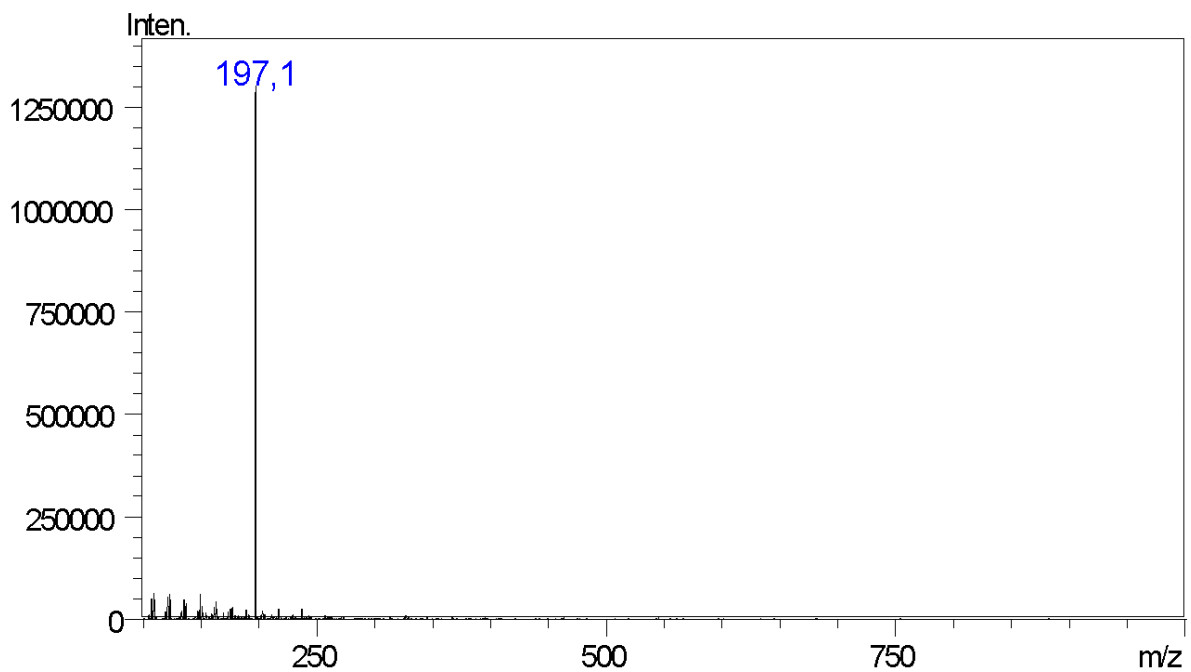


Рисунок 18 - Масс-спектр фрагментного иона убихинона (а) и убихинола (б)

Эффект матрицы (ЭМ) и Степень извлечения (RE) Для определения данных характеристик готовили три типа образцов на каждом из уровней концентраций. Образец А являлся разведением стандартного раствора в смеси

изопропанол:этилацетат с добавлением раствора внутреннего стандарта. Образец **Б** готовили на основе интактной плазмы крови по описанной ниже схеме пробоподготовки, но стандартный раствор убихинона и раствор внутреннего стандарта добавляли к супернатанту после проведения процедур пробоподготовки. Образец **С** готовили как обычный калибровочный образец, добавляя стандартные растворы до пробоподготовки.

Для всех образцов, приготовленных с использованием биологической матрицы, проводили процедуру вычитания эндогенного фона, чтобы получить корректные результаты ЭМ и RE. ЭМ рассчитывали, как частное от деления площади пика убихинона на хроматограмме образца **Б** после вычитания фона на значение площади пика убихинона на хроматограмме образца **А**, результаты выражая в процентах.

Исходя из этого, расчет ЭМ имел следующий вид:

$$\text{ЭМ}(\%) = \frac{B}{A} * 100\%, \quad (2)$$

где

ЭМ - эффект матрицы

Б - площадь пика убихинона на хроматограмме образца **Б**,

А - площадь пика убихинона на хроматограмме образца **А**.

Таким образом, пробоподготовку выполняли следующим образом: 300 мкл плазмы из пустого пула помещали в пробирку типа эппендорф объемом 2 мл. Процедуру экстракции проводили путем добавления 900 мкл смеси изопропанол:этилацетат (1: 1) с последующим встряхиванием в течение 20 секунд и центрифугированием при 14000 об / мин в течение 15 минут. Было отобрано 1170 мкл надосадочной жидкости, к которой добавили 30 мкл стандартного раствора и 10 мкл ВС, затем смесь снова встряхивали и анализировали в ВЭЖХ.

Пробоподготовка для определения фона интактной плазмы была

аналогичной, за исключением добавления стандартного раствора.

Было обнаружено, что 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 и незначительном влиянии соэлюируемых веществ (например, фосфолипидов) на результаты определения убихинона и убихинола.

Степень извлечения рассчитывалась следующим образом:

$$RE(\%) = \frac{C}{A} * 100\%, \quad (3)$$

где

RT - степень извлечения

C- площадь пика убихинона на хроматограмме образца С,

A- площадь пика убихинона на хроматограмме образца А.

Пробоподготовка для раствора С осуществлялась следующим образом: 270 мкл плазмы помещали в 2 мл пробирку типа эппендорф и добавляли 30 мкл рабочего стандартного раствора. Смесь встряхивали на вортексе в течение 20 секунд. К 300 мкл исследуемого раствора добавляли 10 мкл внутреннего стандарта и полученную смесь снова встряхивали в течение 20 секунд. Процедуру экстракции проводили путем добавления 900 мкл смеси изопропанол:этилацетат (1:1) с последующими 20-секундным встряхиванием на вортексе и центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость переносили в виалу.

Степень извлечения (RE) составила от 82,3 до 88,5%. Не наблюдалось значительных различий в ЭМ и RE для образцов гемолитических и гиперлипидемических матриц.

Стабильность. Экспериментально доказано, что долгосрочная стабильность убихинона составляет 6 месяцев при температуре -30°C, убихинола со

стабилизатором - 1 месяц.

Стабильность исходного стандартного раствора составляла 6 месяцев при температуре -30°C для убихинона и 1 месяц для убихинола со стабилизатором.

Касательно стабильности замороженного-размороженного анализа в матрице: образцы выдерживали три цикла замораживания-размораживания.

Стабильность экстракта убихинона при хранении в автосамплере составляла 24 часа, а убихинола со стабилизатором - 6 часов.

Долгосрочная стабильность убихинона и убихинола в плазме со стабилизатором составляет 3 месяца при -30°C . В течение этого времени соотношение убихинон / убихинол остается постоянным, а их абсолютное значение не изменяется. Долгосрочная стабильность без стабилизатора составляет одну неделю для обоих анализируемых веществ при температуре -30°C . Таким образом, без стабилизатора лучше анализировать свежееотобранные пробы плазмы крови.

Процедура приготовления калибровочных проб убихинона и убихинола. Для приготовления калибровочных проб использовался смешанный пул плазмы для уравнивания эндогенного фона. Было проанализировано большое количество проб интактной плазмы, но для подготовки пула использовали те, у которых фон CoQ10 был ниже.

Калибровочные растворы готовили следующим образом: 270 мкл плазмы помещали в 2 мл пробирку типа эппендорф и добавляли 30 мкл рабочих стандартных растворов убихинона и убихинола. Смесь встряхивали на вортексе в течение 20 секунд. К 300 мкл калибровочного (исследуемого) раствора добавляли 10 мкл внутреннего стандарта и полученную смесь снова встряхивали в течение 20 секунд. Процедуру экстракции проводили путем добавления 900 мкл смеси изопропанол:этилацетат (1:1) с последующими 20-секундным встряхиванием на вортексе и центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость переносили в виалу.

Учитывая, что убихинол быстро окисляется до убихинона, и возможны потери несмотря на добавление стабилизатора, от одномоментного определения

убихинона и убихинола отказались. Были разработаны 2 модификации методики, а именно: для количественного определения убихинона (со стабилизацией убихинола) 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). Согласно литературным данным, DDQ является сильным окислителем, однако до этих пор не применялся для окисления убихинола с целью последующего определения общего CoQ10. Убихинол, в свою очередь, определялся по разности концентраций общего CoQ10 и убихинона. Данный подход обеспечивает возможность достоверно и надежно определять концентрацию убихинона, убихинола и редокс статус CoQ10 в плазме крови пациентов. Поэтому, из всех проб плазмы крови больных брали две аликвоты - для количественного определения убихинона и общего CoQ10.

На рисунках 19 и 20 представлены хроматограммы плазмы крови больного с одновременным определением убихинона и убихинола и хроматограмма плазмы крови того же больного после окисления убихинола с последующим определением общего CoQ10, который свидетельствует о полном окислении убихинола до убихинона.

В разделах 3.3.1 - 3.3.3. следует детальное описание пробоподготовок для количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10.

Достоверность результатов количественного определения оценивалось по результатам шести параллельных измерений концентрации убихинона, убихинола и общего CoQ10 в четырех образцах плазмы крови согласно Государственной Фармакопее XIV издания, рассчитывались метрологические характеристики методики.

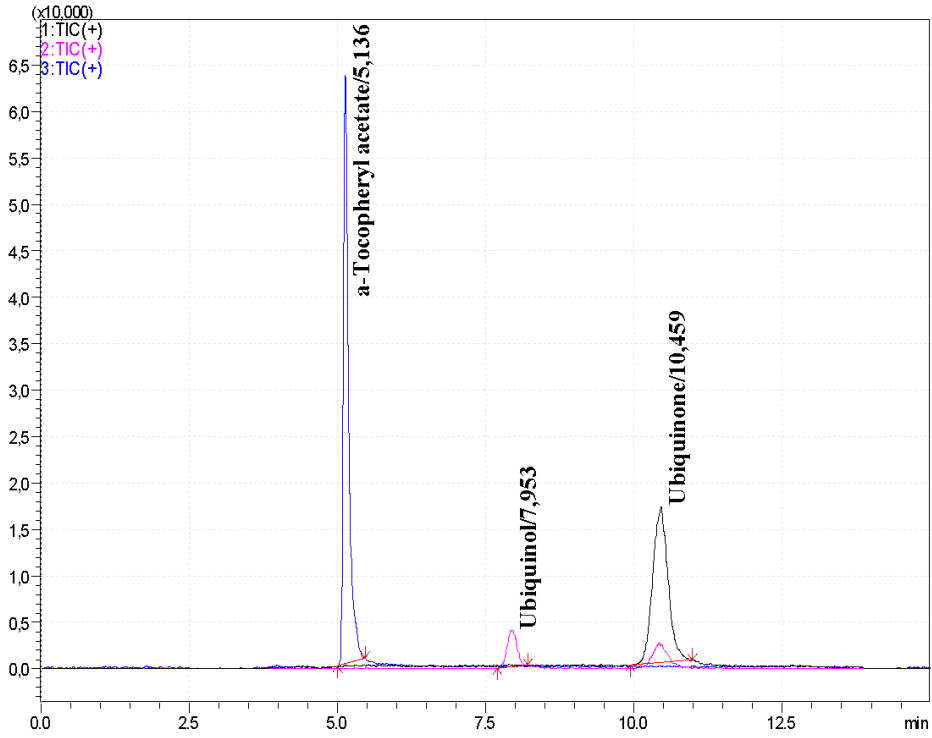


Рисунок 19 - Хроматограмма убихинона и убихинола в плазме крови больного с ХСН

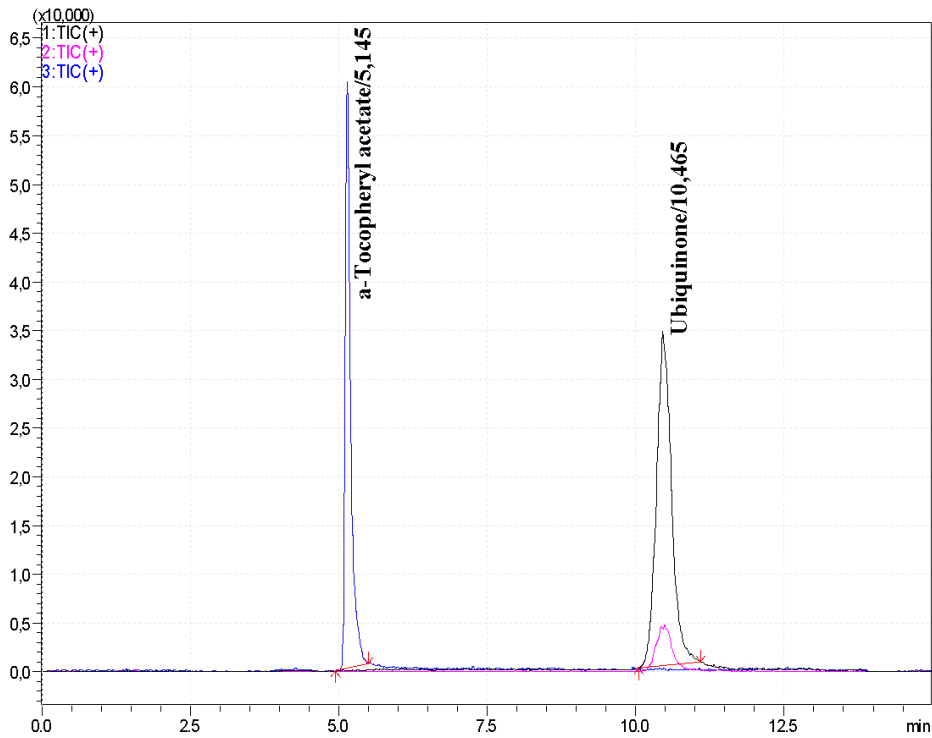


Рисунок 20 - Хроматограмма общего CoQ10 в плазме крови больного с ХСН

3.2.1. Количественное определение убихинона в плазме крови

Приготовление образца. К 300 мкл плазмы добавляли 30 мкл раствора бутилгидроксианизола (ВНА) с концентрацией 100 мкг/мл и встряхивали 20 секунд на вортексе. После этого к полученной смеси добавляли 10 мкл внутреннего стандарта и снова встряхивали в течение 20 секунд. Процедуру экстракции проводили путем добавления 900 мкл смеси изопропанол:этилацетат (1:1) с последующими 20-секундным встряхиванием на вортексе и центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость переносили в виалу. Эта модификация пробоподготовки позволяла сохранить убихинол в неокисленной форме и соответственно достоверно определять концентрацию убихинона.

Калибровочный график. К 270 мкл смешанного пула плазмы добавляли 30 мкл стандартного раствора убихинона, чтобы концентрация убихинона в калибровочных пробах составляла: 0,10 мкг / мл, 0,25 мкг / мл, 0,50 мкг / мл, 0,75 мкг / мл, 1,00 мкг / мл, 1,50 мкг / мл и 2,00 мкг / мл. Далее пробы обрабатывали по описанной выше методике (Таблица 20).

Таблица 20 - Расчет концентраций добавок стандартного раствора убихинона в плазму крови в калибровочных пробах

Концентрация стандартного раствора убихинона, мкг/мл	Концентрация убихинона в плазме, мкг/мл
20,00	2,00
15,00	1,50
10,00	1,00
7,50	0,75
2,50	0,25
1,00	0,10

Калибровочный график зависимости отношения площадей пиков убихинона к внутреннему стандарту была построена с использованием модели

взвешенной регрессии, которая обеспечивает приемлемые отклонения измеренных значений от номинальных (Рисунок 21). В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была линейной, уравнение регрессии имело вид:

$$y = 0,4351x + 0,2934 , \quad (4)$$

где

x – отношение концентрации убихинона к концентрации токоферола,

y – отношение площадей хроматографических пиков убихинона и внутреннего стандарта (токоферол ацетата).

Коэффициент аппроксимации составил $R^2=0,9917$.

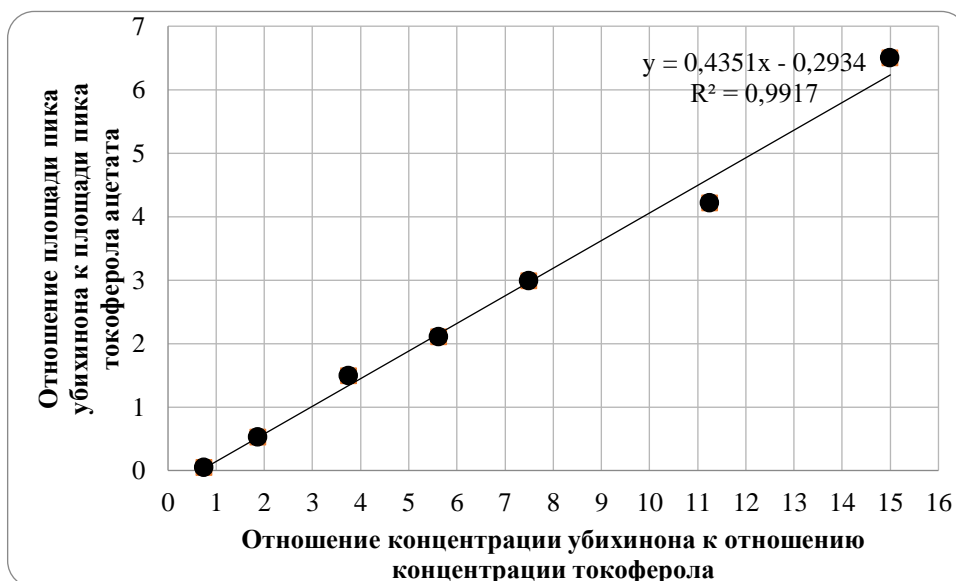


Рисунок 21 - Калибровочный график зависимости отношения площадей хроматографических пиков убихинона и внутреннего стандарта от отношения концентраций убихинона и внутреннего стандарта

В Таблице 21 представлены внутридневная точность и прецизионность разработанной методики определения общего CoQ10 в плазме крови.

Таблица 21 - Метрологические характеристики количественного определения убихинона в плазме крови

μ , мкг/мл	Найдено	F	\bar{x}	S^2	S (n=6)	$S\sigma$	P%	$t_{\text{табл.}}$	$t_{\text{выч}}$	Δx	$\Delta \bar{x}$	ξ , %	$\bar{\xi}$, %	\bar{x} , %	$S\sigma$, %
Внутридневная															
0,1	0,108	5	0,101	0,00011	0,010635	0,00434	95	2,57	0,12	0,0273	0,01116	27,20	11,1	11,16	4,32
	0,095														
	0,086														
	0,108														
	0,093														
	0,113														
0,5	0,501	5	0,534	0,00244	0,04938	0,02016	95	2,57	1,69	0,1269	0,05181	23,77	9,71	10,36	3,78
	0,545														
	0,587														
	0,596														
	0,486														
	0,489														
0,75	0,771	5	0,730	0,00083	0,002438	0,01177	95	2,57	1,67	0,0741	0,03025	10,15	4,14	2,94	1,61
	0,71														
	0,745														
	0,689														
	0,742														
	0,725														
1,0	1,04	5	0,985	0,00183	0,0428	0,01747	95	2,57	0,86	0,11	0,04491	11,16	4,56	4,49	1,77
	0,961														
	0,952														
	1,04														
	0,968														
	0,951														

Продолжение Таблицы 21

Междневная															
0,1	0,123	5	0,10733	0,00031	0,017671	0,00721	95	2,57	1,02	0,04541	0,01854	42,31	17,27	18,54	6,72
	0,098														
	0,135														
	0,101														
	0,098														
	0,089														
0,5	0,488	5	0,51567	0,00377	0,061396	0,02506	95	2,57	0,63	0,1579	0,06442	30,60	12,49	12,88	4,86
	0,561														
	0,543														
	0,597														
	0,471														
	0,434														
0,75	0,721	5	0,71767	0,00125	0,035359	0,01444	95	2,57	2,24	0,09087	0,0371	12,66	5,17	4,95	2,01
	0,718														
	0,698														
	0,713														
	0,675														
	0,781														
1,0	1,12	5	0,98967	0,00481	0,069319	0,0283	95	2,57	0,37	0,17815	0,07273	18,00	7,35	7,27	2,86
	0,943														
	0,934														
	1,01														
	0,975														
	0,956														

Примечание: μ – истинное значение измеряемой величины, f - число степеней свободы, S - стандартное отклонение, S^2 - дисперсия, $S\sigma$ - 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 и среднего результата; ξ - относительная ошибка среднего результата, $\bar{x}\%$ - отклонение от среднего результата, $S\sigma, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата.

Из данных, приведенных в таблице, следует, что относительная погрешность среднего результата не превышала 11,1% на концентрации 0,1 мкг/мл и 9,7% на остальных точках при оценке внутрисуточной точности, а также не превышала 17,3% на концентрации 0,1 мкг/мл и 12,5% на остальных концентрациях при оценке междневной точности. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляют 0,01; 0,05; 0,03 и 0,04 соответственно для концентрации убихинона 0,1; 0,5; 0,75; 1,0 плазмы крови. Истинное содержание убихинона в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика свободна от систематических ошибок.

НПКО составил 0,10 мкг/мл в соответствии с данными о точности и прецизионности. Не удалось количественно определить убихинон на уровне 0,05 мкг/мл, потому что в этом случае относительная ошибка превышала 20%, поэтому этот уровень был исключен из дальнейших исследований.

3.2.2. Количественное определение общего CoQ10 в плазме крови

Приготовление образца биопробы. Пробоподготовка для определения общего CoQ10 осуществлялась таким образом, чтобы определить сумму убихинона и убихинола, а именно: 300 мкл плазмы помещали в 2 мл пробирку типа эппендорф и добавляли 10 мкл внутреннего стандарта (токоферол ацетата) и встряхивали в течение 20 секунд. Процедуру экстракции проводили путем добавления 900 мкл смеси изопропанол:этилацетат (1:1) с последующими 20 - секундным встряхиванием на вортексе и центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут. После того, как надосадочную жидкость переносили в виалу, окисление убихинола осуществлялось путем добавления 10 мкл муравьиной кислоты и 10 мкл раствора DDQ с концентрацией 1 мг /мл.

В качестве окислителя при определении общего CoQ10 был выбран DDQ, так как стандартный электродный потенциал (E^0) для пары DDQ/DDQH₂ составляет примерно 0,750 В, что выше E^0 для пары CoQ10/CoQ10H₂ (0,097 В) и способствует протеканию реакции, показанной на Рисунке 22. Данная реакция сопряжена с переносом протона, поэтому окисление убихинола до убихинона проводили в кислой среде. Также известно, что при $pH > 7$ стабилизируются промежуточные продукты реакции (свободные радикалы, называемые семихинонами), которые не являются объектами исследования, и избежать их образования также помогает добавление муравьиной кислоты.

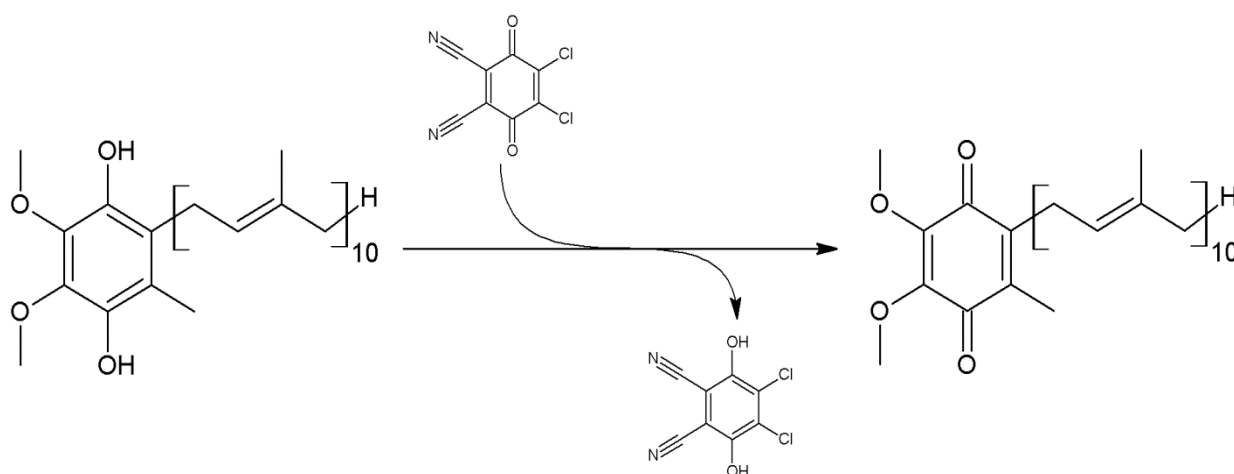
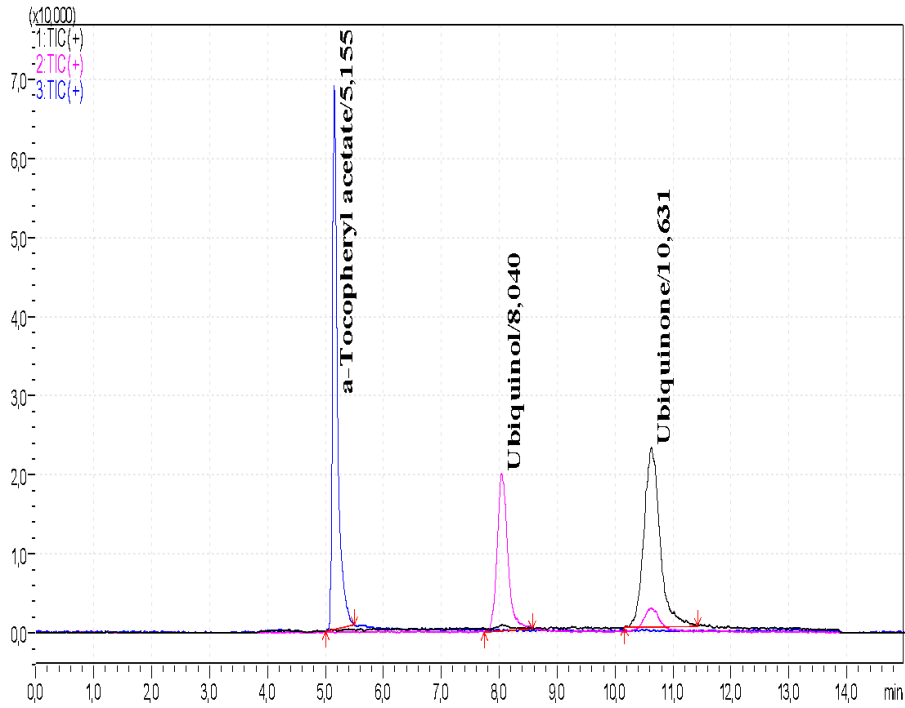


Рисунок 22 - Схема окисления убихинола до убихинона под действием 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинона (DDQ)

Источник: Разработано автором

Типичная хроматограмма убихинола и убихинона в плазме крови человека в калибровочной пробе представлена на Рисунке 23а. Хроматограмма той же пробы, приготовленной с окислением убихинола до убихинона для определения общего CoQ10, представлена на Рисунке 23б.

а)



б)

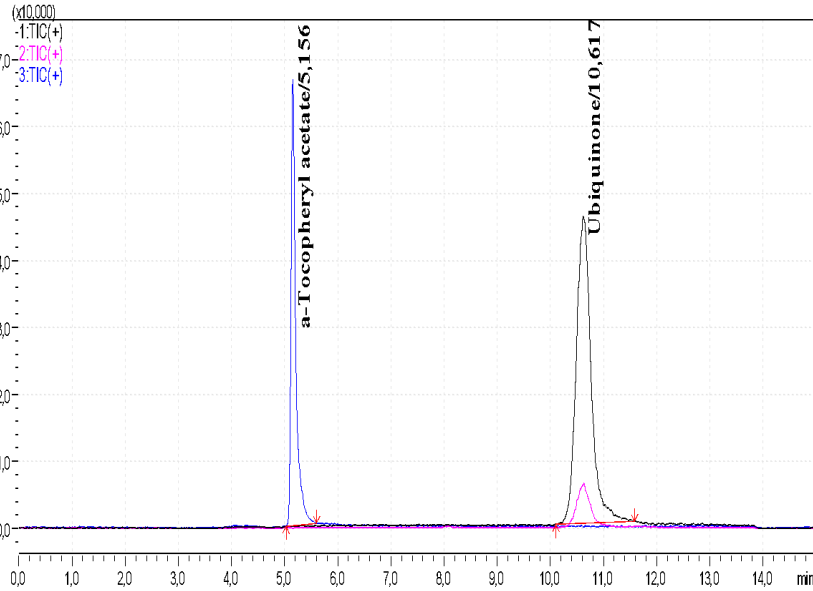


Рисунок 23 - Хроматограмма определения убихинона и убихинола (а) и общего CoQ10 после окисления убихинола (б) в плазме крови в калибровочной пробе методом ВЭЖХ-МС/МС

Калибровочный график. К 270 мкл плазмы помещали в 2 мл пробирку типа эппендорф и добавляли по 15 мкл рабочих стандартных растворов убихинона и

убихинола, чтобы концентрация общего CoQ10 в калибровочных пробах составляла: 0,10 мкг / мл, 0,25 мкг / мл, 0,50 мкг / мл, 0,75 мкг / мл, 1,00 мкг / мл, 1,5 мкг/мл, 2,0 мкг/мл, 2,50 мкг / мл и 5,00 мкг / мл (Таблица 22). Далее обработка калибровочных проб проводилась, как описано выше.

Таблица 22 - Расчет концентраций добавок стандартных растворов убихинона и убихинола в плазму крови в калибровочных пробах

Концентрация стандартного раствора убихинона, мкг/мл	Концентрация стандартного раствора убихинола, мкг/мл	Концентрация общего CoQ10 в плазме, мкг/мл
25,00	25,00	5,00
12,5	12,5	2,50
10,00	10,00	2,00
7,5	7,5	1,50
5,00	5,00	1,00
3,75	3,75	0,75
1,25	1,25	0,25
0,5	0,5	0,10

Перед анализом калибровочных образцов были проанализировали 6 проб интактной плазмы без каких-либо добавок для определения среднего эндогенного фона CoQ10.

Калибровочный график зависимости отношения площадей пиков общего CoQ10 к внутреннему стандарту изображена на Рисунке 24. В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была линейной, уравнение регрессии имело вид:

$$y = 0,5332x + 0,1189 , \quad (5)$$

где

x – отношение концентрации общего CoQ10 к концентрации токоферола ацетата

y – отношение площадей хроматографических пиков общего CoQ10 и внутреннего стандарта (токоферол ацетата)

Коэффициент аппроксимации составил $R^2=0,9946$.

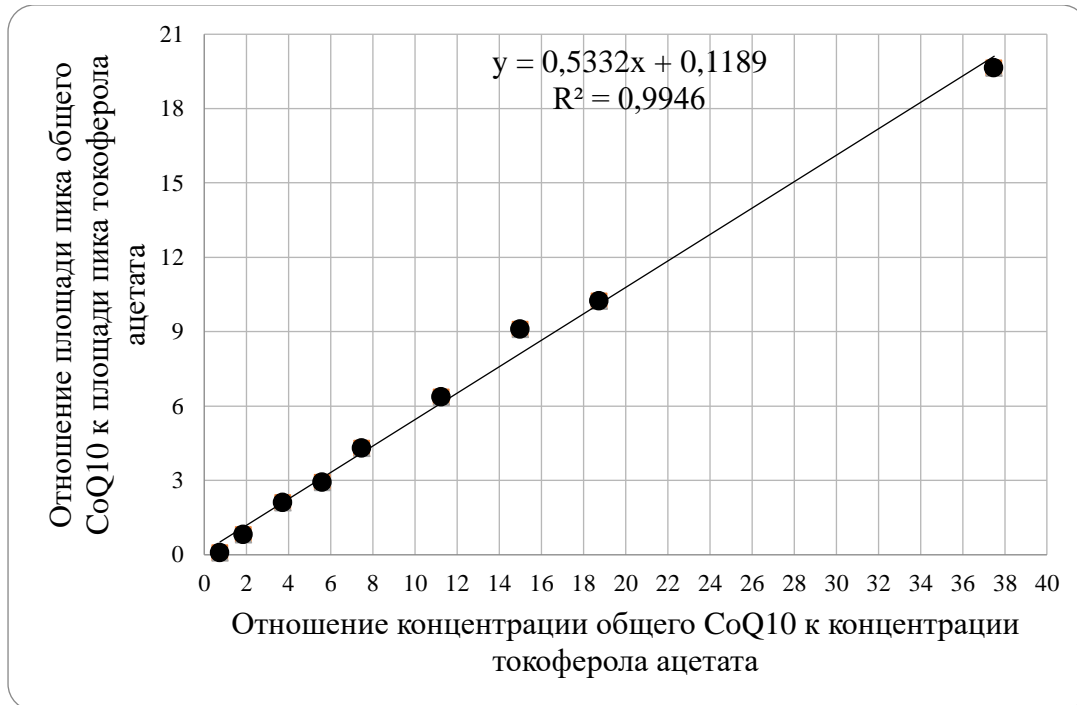


Рисунок 24 - Калибровочный график зависимости отношения площадей хроматографических пиков общего CoQ10 и внутреннего стандарта от отношения концентраций общего CoQ10 и внутреннего стандарта

В Таблице 23 представлены внутридневная точность и прецизионность разработанной методики определения общего CoQ10 в плазме крови.

Таблица 23 - Метрологические характеристики количественного определения общего СоQ10 в плазме крови

μ , МКГ/МЛ	Найдено	F	\bar{x}	S^2	S (n=6)	S σ	P%	t _{табл.}	t _{выч.}	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\xi, \%$	ξ	$\bar{x} \%$	S $\sigma, \%$
Внутридневная															
0,1	0,115	5	0,0965	0,00015	0,01211	0,00494	95	2,57	0,71	0,03113	0,01271	32,26	13,17	12,71	5,12
	0,084														
	0,105														
	0,097														
	0,084														
	0,094														
0,5	0,556	5	0,5388	0,00159	0,03985	0,01627	95	2,57	2,39	0,10241	0,04181	19,01	7,76	8,36	3,02
	0,599														
	0,518														
	0,501														
	0,561														
	0,498														
1,0	0,887	5	1,037	0,01152	0,10731	0,04381	95	2,57	0,84	0,27579	0,11259	26,59	10,86	11,26	4,22
	1,195														
	1,04														
	0,998														
	1,115														
	0,987														
5,0	4,958	5	4,587	0,20548	0,4533	0,18506	95	2,57	2,23	1,16497	0,4756	27,40	10,37	9,51	4,03
	4,126														
	5,12														
	4,351														
	4,881														
	4,086														

Продолжение Таблицы 23

Междневная															
0,1	0,101	5	0,09467	0,00018	0,01328	0,00542	95	2,57	0,98	0,03412	0,01393	36,04	14,71	13,93	5,73
	0,079														
	0,087														
	0,113														
	0,104														
	0,084														
0,5	0,523	5	0,51583	0,00289	0,05379	0,02196	95	2,57	0,72	0,13825	0,05644	26,80	10,94	11,59	4,26
	0,485														
	0,428														
	0,575														
	0,563														
	0,521														
1,0	0,784	5	0,92717	0,01455	0,12064	0,04925	95	2,57	1,48	0,31004	0,12657	33,44	13,65	12,66	5,31
	1,023														
	0,821														
	0,934														
	1,103														
	0,898														
5,0	4,897	5	4,81517	0,32325	0,56855	0,23211	95	2,57	0,80	1,46117	0,59652	30,35	12,39	11,93	4,82
	4,675														
	5,551														
	4,289														
	5,356														
	4,123														

Примечание: μ – истинное значение измеряемой величины, f - число степеней свободы, S - стандартное отклонение, S^2 - дисперсия, $S\sigma$ - 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 и среднего результата; $\bar{\xi}$ - относительная ошибка среднего результата, $\bar{x}\%$ - отклонение от среднего результата, $S\sigma, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата

Из данных, приведенных в таблице, следует, что относительная погрешность среднего результата не превышала 13,2% на концентрации 0,1 мкг/мл и 10,9% на остальных точках при оценке внутрисуточной точности, а также не превышала 14,7% на концентрации 0,1 мкг/мл и 13,7% на остальных концентрациях при оценке междневной точности. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляют 0,01; 0,04; 0,11 и 0,47 соответственно для концентрации общего CoQ10 0,1; 0,5; 1,0 и 5,0 плазмы крови. Истинное содержание общего CoQ10 в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика свободна от систематических ошибок.

3.2.3. Количественное определение убихинола в плазме крови

Концентрация убихинола рассчитывалась как разность определений общего CoQ10 (пункт 3.3.2.) и убихинона (пункт 3.3.1) согласно формуле:

$$c(\text{CoQ10H}_2) = c(\text{CoQ10}_{\text{общ.}}) - c(\text{CoQ10}), \quad (5)$$

где

$c(\text{CoQ10H}_2)$ – концентрация убихинола, мкг/мл

$c(\text{CoQ10}_{\text{общ.}})$ – концентрация общего CoQ10, мкг/мл

$c(\text{CoQ10})$ – концентрация убихинона, мкг/мл

Калибровочный график для количественного определения концентраций

убихинола в плазме крови представлен на Рисунке 25. В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была линейной, уравнение регрессии имело вид:

$$y = 0,1857x - 0,1057, \quad (6)$$

где

x – разница отношений концентраций общего CoQ10 к токоферол ацетату и убихинона к токоферол ацетату (мкг/мл),

y – разница площадей пиков общего CoQ10 к токоферол ацетату и убихинона к токоферол ацетату.

Коэффициент аппроксимации составил $R^2=0,9902$.

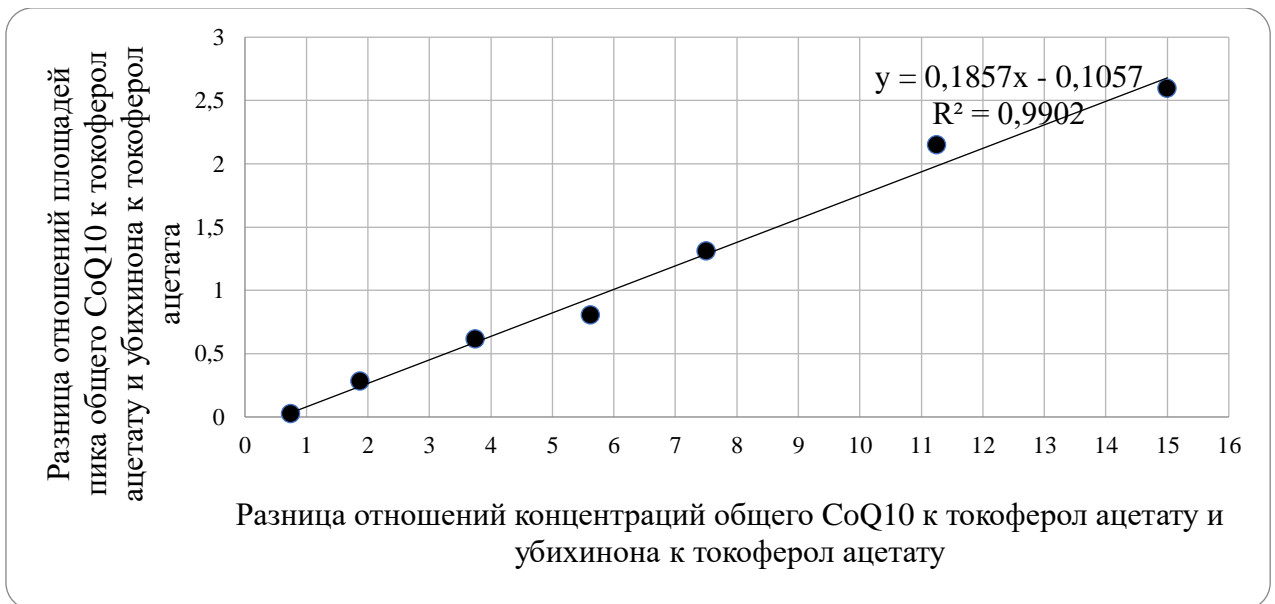


Рисунок 25 - Калибровочный график зависимости разницы отношений площадей пика общего CoQ10 к токоферол ацетату и убихинона к токоферол ацетату от разницы отношений концентраций общего CoQ10 к токоферол ацетату и убихинона к токоферол ацетату

В Таблице 24 представлены внутрисуточная и междневная точность и прецизионность разработанной методики определения убихинола в плазме крови.

Таблица 24 - Метрологические характеристики количественного определения убихинола в плазме крови

μ , МКГ/МЛ	Найдено	f	\bar{x}	S^2	S (n=6)	S σ	P %	t _{табл.}	t _{выч.}	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\xi, \%$	$\bar{\xi}, \%$	$\bar{x}, \%$	S $\sigma\%$
Внутридневная															
0,1	0,088	5	0,0963	0,0002	0,01558	0,00636	95	2,57	0,58	0,04003	0,01634	41,56	16,97	16,34	6,60
	0,086														
	0,101														
	0,116														
	0,076														
	0,111														
0,5	0,543	5	0,5142	0,0006	0,02410	0,00984	95	2,57	1,44	0,06195	0,02529	12,05	4,92	5,06	1,91
	0,512														
	0,477														
	0,499														
	0,519														
	0,535														
0,75	0,701	5	0,6882	0,0040	0,0635	0,02592	95	2,57	2,38	0,1632	0,06663	23,72	9,68	3,33	3,77
	0,670														
	0,604														
	0,705														
	0,794														
	0,655														
1,0	1,145	5	1,0055	0,0092	0,09573	0,03908	95	2,57	0,14	0,24603	0,10044	24,47	9,99	10,04	3,89
	1,102														
	0,976														
	0,965														
	0,942														
	0,903														

Продолжение Таблицы 24

Междневная															
0,1	0,075	5	0,09883	0,00032	0,017949	0,00733	95	2,57	0,16	0,04613	0,01883	46,6735	19,05	18,83	7,41
	0,087														
	0,123														
	0,116														
	0,098														
	0,094														
0,5	0,546	5	0,49717	0,00075	0,027418	0,01119	95	2,57	0,25	0,07047	0,02877	14,1734	5,79	5,75	2,25
	0,476														
	0,503														
	0,488														
	0,469														
	0,501														
0,75	0,701	5	0,69417	0,00321	0,056644	0,02312	95	2,57	2,41	0,14558	0,05943	20,9713	8,56	2,97	3,33
	0,791														
	0,654														
	0,722														
	0,643														
	0,654														
1,0	1,045	5	1,01033	0,0141	0,118729	0,04847	95	2,57	0,21	0,30513	0,12457	30,2014	12,33	12,46	4,80
	0,889														
	1,143														
	0,988														
	0,864														
	1,133														

Примечание: μ – истинное значение измеряемой величины, f - число степеней свободы, S - стандартное отклонение, S^2 - дисперсия, $S\sigma$ - 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 и среднего результата; $\bar{\xi}$ - относительная ошибка среднего результата, $\bar{x}\%$ - отклонение от среднего результата

Из данных, приведенных в таблице, следует, что относительная погрешность среднего результата не превышала 16,97% на концентрации 0,1 мкг/мл и 9,99% на остальных точках при оценке внутрисуточной точности, а также не превышала 19% на концентрации 0,1 мкг/мл и 12,3% на остальных концентрациях при оценке междневной точности. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляют 0,02; 0,02; 0,05 и 0,1 соответственно для концентрации убихинола 0,1; 0,5; 0,75; 1,0 плазмы крови. Истинное содержание убихинола в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика свободна от систематических ошибок.

3.3. Выводы по главе

1. Подобраны оптимальные условия изолирования убихинона из плазмы крови: при разработке методики ВЭЖХ-УФ для жидкостной экстракции использовали диэтиловый эфир с последующим упариванием и перерастворением в этаноле, а при разработке методики ВЭЖХ-МС/МС для осаждения белков использовали смесь изопропанол:этилацетат (1:1).

2. Предложены оптимальные условия хроматографического определения убихинона: для метода ВЭЖХ-УФ предложен изократический режим элюирования с подвижной фазой этанол:изопропанол (90:10), скоростью потока 0,8 мл/мин и температурой колонки 40°C. Длина волны для определения убихинона составляла 275 нм. Для метода ВЭЖХ-МС/МС использовали режим ESI в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме MRM (мониторинг

множественных реакций). Ион-предшественник соответствовал $[M+NH_4]^+$: 880,7 m/z , а фрагментный ион – 197,1 m/z . В качестве внутреннего стандарта выбран токоферол ацетат, ион-предшественник которого соответствовал протонированному молекулярному иону $[M+H]^+$ с 473,25 m/z . Дочерние ионы: 207,00 и 165,10 m/z .

3. Разработана чувствительная и воспроизводимая методика количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Валидация методики проведена по следующим параметрам: линейность, точность, прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, стабильность. Относительная погрешность среднего результата не превышала 11,1% на нижней концентрации и 9,7% на всех остальных точках для убихинона, 13,2% и 11,1% для общего CoQ10, 16,97% и 9,99% для убихинола, соответственно. Предел детектирования составил 0,10 мкг/мл.

4. Предложена методика количественного определения убихинола с использованием метода вычитания. Для этого из проб плазмы крови больных брались 2 аликвоты: сначала в одной аликвоте плазмы определяли концентрацию убихинона с добавлением стабилизатора (бутилгидроксианизол) до пробоподготовки, что позволяло сохранить убихинол в неокисленной форме и поэтому он не искажал результаты определения убихинона. Во второй аликвоте плазмы крови определяли концентрацию общего CoQ10. После обработки плазмы крови убихинол с целью определения общего CoQ10 (сумма убихинола и убихинона). Затем, концентрацию убихинола вычисляли по разнице концентрации общего CoQ10 и убихинона.

5. Для окисления убихинола до убихинона с целью последующего определения общего CoQ10 впервые предложено использовать смесь 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинона (DDQ) и муравьиной кислоты

6. Разработанная методика количественного определения убихинона методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором может быть использована для определения эндогенной концентрации убихинона у практически здоровых

лиц, а также в биофармацевтическом анализе и контроле качества препаратов.

7. Разработанная методика количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 методом ВЭЖХ с МС-детектированием может быть использована для количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови больных, в том числе для изучения редокс-статуса CoQ10.

**ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СОДЕРЖАНИЯ УБИХИНОЛА,
УБИХИНОНА, ОБЩЕГО CoQ10 И ЕГО РЕДОКС-СТАТУСА У БОЛЬНЫХ
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, АРТЕРИАЛЬНОЙ
ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ (II-III ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КЛАСС ПО NYHA)**

**4.1. Определение эндогенного уровня общего CoQ10 в плазме крови
практически здоровых лиц**

Индивидуальные значения эндогенной концентрации общего CoQ10 в плазме крови 54 практически здоровых лиц представлены на Рисунке 26, а усредненные значения и результаты статистической обработки приведены в Таблице 25.

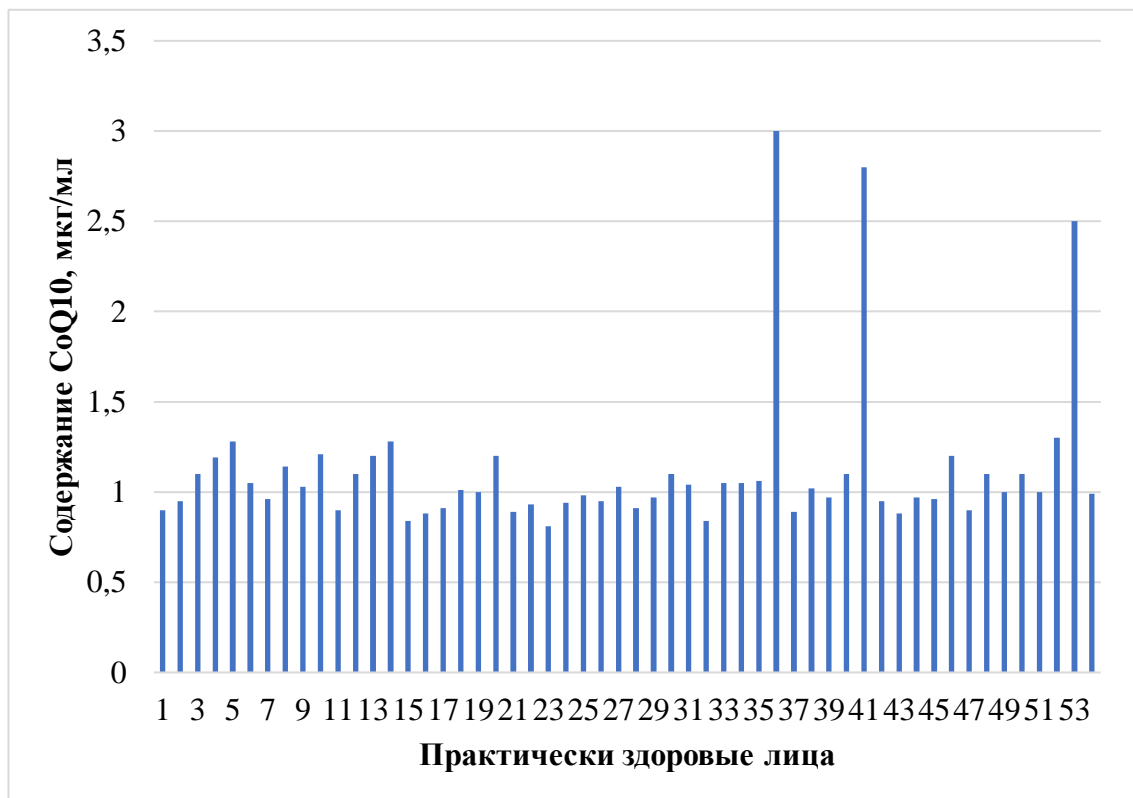


Рисунок 26 - Индивидуальные значения концентрации CoQ10 в плазме крови практически здоровых лиц

Таблица 25 - Усредненные значения эндогенной концентрации общего CoQ10 в плазме крови практически здоровых лиц (мкг/мл)

Параметр	Значения
n	54
Mean	1,116
S.D.	0,423
S.E.	0,057
C.V., %	37,91
Нижняя граница 95% доверительного интервала	1,001
Верхняя граница 95% доверительного интервала	1,233
Тест Колмогорова-Смирнова	0,3018 p<0,10

Следует отметить, что индивидуальные уровни общего CoQ10 в плазме крови практически здоровых лиц варьировали в пределах от 0,84 до 1,30 мкг/мл, за исключением трех человек, у которых концентрация общего CoQ10 была значительно выше – 2,5, 2,8 и 3,00 мкг/мл. Результаты, полученные в ходе исследования, хорошо согласуются с литературными данными [6, 20, 61, 150].

4.2. Определение эндогенных плазменных уровней убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и II-III ФК ХСН

Индивидуальные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных ХСН, ИБС и АГ представлены в Таблицах 28-31 (раздел 4.3), а усредненные значения – в Таблице 26. При проведении сравнительного анализа концентрации CoQ10 у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями и у здоровых добровольцев при помощи теста Колмогорова-Смирнова было определено неравенство дисперсий, соответственно прибегли к

непараметрическому тесту Манна-Уитни (Таблица 26).

Таблица 26 - Усредненные значения эндогенной концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных I группы (II-III ФК ХСН) и практически здоровых лиц (мкг/мл)

Параметр	Больные I группы	Практически здоровые лица
n	62	54
Mean	0,569*	1,116
S.D.	0,116	0,423
S.E.	0,014	0,057
S.V., %	20,495	37,91
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,5402	1,001
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,599	1,233
Тест Колмогорова-Смирнова	0,0078 p>0,10	0,3018 p<0,10
Тест Манна-Уитни	2,00	

Примечание: * - статистически достоверное различие по сравнению с практически здоровыми лицами, ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания.

Гипотеза о незначительности различий отвергалась. Различия между группами определялись как существенные с 95% достоверностью. Следовательно, концентрация общего CoQ10 статистически достоверно ниже у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с практическими здоровыми лицами (в среднем -49,01 Δ%).

Индивидуальные значения концентрации убихинола и убихинона в плазме крови больных ХСН, ИБС и АГ представлены в Таблицах 28-31 (раздел 4.3), а усредненные значения – в Таблице 27. По полученным значениям концентрации убихинола и убихинона рассчитывали значения редокс-статуса CoQ10 в плазме крови больных как отношение индивидуальных значений концентрации убихинола к концентрации убихинона (в мкг/мл), а также как соотношение индивидуальных уровней убихинола и убихинона (в % от общего CoQ10).

Таблица 27 – Усредненные значения концентраций убихинола, убихинона и редокс статуса CoQ10 в плазме крови больных первой группы

Параметр	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
n	62	62	62	62	62
Mean	0,192	32,79	0,378	67,21	0,530
S.D.	0,087	10,49	0,077	10,49	0,282
S.E.	0,011	1,332	0,010	1,332	0,036
C.V., %	45,13	31,98	20,46	15,60	53,33
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,170	30,129	0,358	64,554	0,457
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,214	35,455	0,398	69,881	0,601

Примечание: редокс-статус – отношение концентрации убихинола к концентрации убихинона

Чтобы сравнить полученные данные со средним значением, которое принято за норму у здоровых пациентов согласно литературным данным (95%), был проведен t-тест Стьюдента для одной выборки. Обнаружили что t - критерий был равен 127,65 со степенью свободы 61. Значение $p < 0,0001$ означает, что существует статистически значимое различие между средним выборки по концентрации убихинола в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями и средним значением у практически здоровых лиц.

Для сравнения процентного содержания убихинона в плазме крови пациентов с литературными данными за нулевую гипотезу было принято то, что процентное содержание убихинона должно быть 5%. При проведении t-теста Стьюдента для одной выборки, t - критерий был равен 127,46 с 61 степенью свободы. Значение $p < 0,0001$ означает, что существует статистически значимое различие между средним выборки по концентрации убихинола в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями и средним значением у здоровых лиц.

Гистограммы с содержанием убихинона и убихинола в процентах от уровня общего CoQ10 у каждого пациента, а соотношение содержания убихинола и убихинона у практических здоровых лиц и больных первой группы представлены

на Рисунках 28 и 29 соответственно.

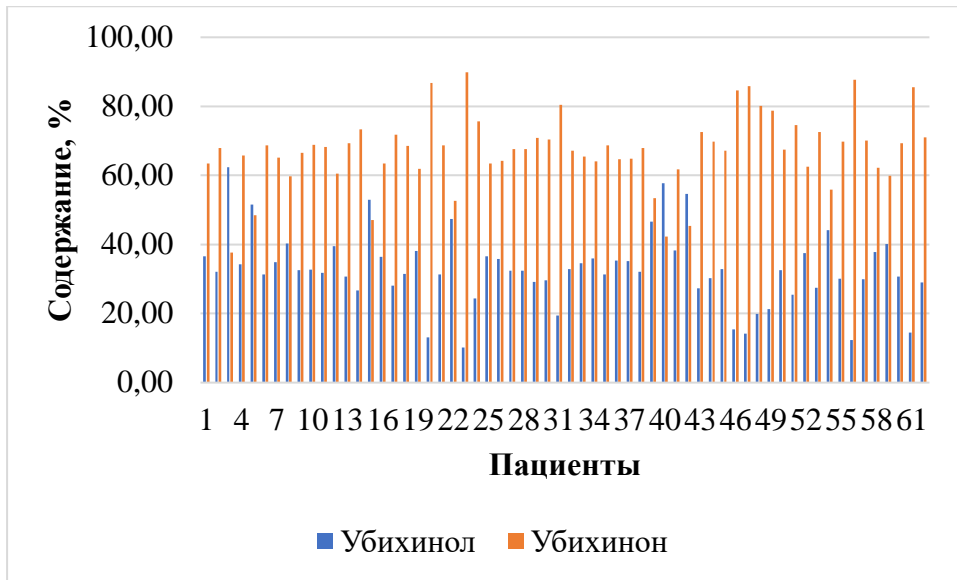


Рисунок 27 - Индивидуальные значения содержания убихинола и убихинона в плазме крови больных первой группы

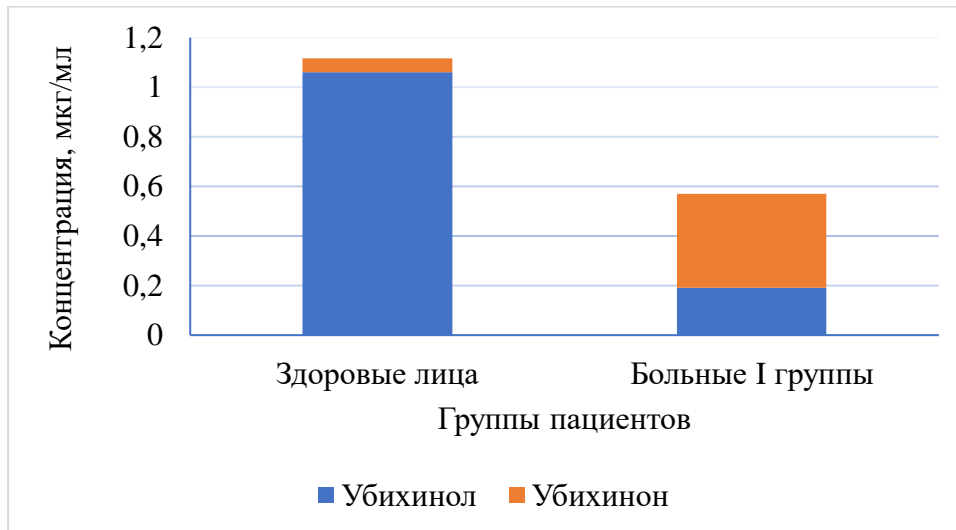


Рисунок 28 - Соотношение содержания убихинола и убихинона у практических здоровых лиц и больных первой группы

Исходя из полученных значений, можно сделать заключение, что по сравнению со здоровыми добровольцами понижается не только эндогенный уровень общего CoQ10, но и статистически значимо изменяется баланс убихинол:убихинон в сторону окисленной формы (95:5 у здоровых vs 32,79:67,21 у больных с сердечно-сосудистыми патологиями (Рисунок 29). Это

свидетельствует о резком повышении потребления убихинола в связи с усилением оксидативного стресса и накоплением окислителей в организме.

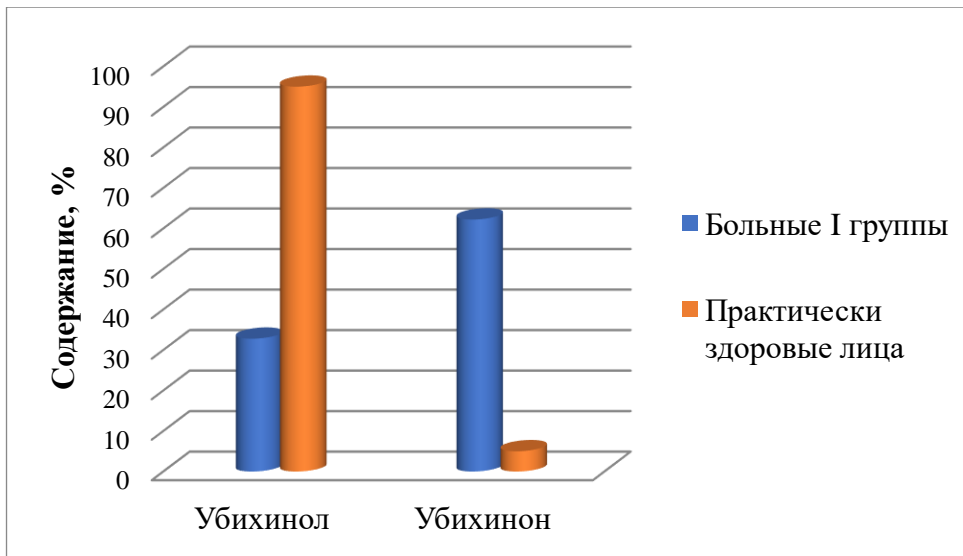


Рисунок 29 - Сравнение усредненного значения содержания убихинола и убихинона у здоровых добровольцев и у больных первой группы

Установлено, что по сравнению со здоровыми добровольцами у больных II-III ФК ХСН, ИБС и АГ соотношение концентраций убихинола и убихинона изменяется в сторону окисленной формы. Так, отношение значений концентрации убихинол/убихинон у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями в среднем составило $0,530 \pm 0,036$, что значительно ниже литературных данных у здоровых лиц (от 11,9 до 50,2) [11, 14, 50]. Соотношение убихинол:убихинон (в % от общего CoQ10) у больных в среднем составило 32,79:67,22, что резко отличается от литературных данных у здоровых лиц (в среднем 95:5, но не менее 87:13) [11, 13, 14, 50]. Это может свидетельствовать о том, что антиоксидантная система организма у больных не справляется с накопившимися окислителями и, соответственно, о необходимости добавления в терапию больным сердечно-сосудистыми заболеваниями антиоксидантов и/или препаратов, содержащих CoQ10. Таким образом, определение редокс-статуса CoQ10 является косвенным, но надежным показателем усиления оксидативного стресса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

4.3. Влияние некоторых лекарственных средств на эндогенный уровень убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и II-III ФК ХСН

Больные сердечно-сосудистыми заболеваниями (II-III ФК ХСН, ИБС и АГ), согласно принимаемой терапии, были распределены в 4 группы (А, Б, В, Г):

- 1) Принимающие аторвастатин (статины), бисопролол/метопролол (β -блокаторы) (группа А, n=15)
- 2) Принимающие аторвастатин (статины), бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Б, n=17);
- 3) Принимающие бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа В, n=18);
- 4) Принимающие этоксидол (антиоксидант) бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Г, n=12).

Отдельно оценить влияние препаратов только одной группы (статинов или β -блокаторов) оказалось невозможным ввиду того, что рассмотренные сердечно-сосудистые патологии подразумевают хронизацию процессов, что влечет за собой прием сразу несколько групп препаратов одновременно. Следовательно, некорректно было бы не учитывать влияние той или иной группы препаратов на уровень CoQ10. Также, было нецелесообразно рассматривать уровень CoQ10 до и после лечения, так как, в основном, пациенты находятся на длительной или постоянной (пожизненной) терапии.

Индивидуальные значения концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных, принимающих препараты из вышеизложенных групп, представлены в Таблицах 28-31, а усредненные значения и результаты проведенного статистического анализа – в Таблицах 32-34.

Таблица 28 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных из группы А

Номер пациента	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
1	0,600	0,215	35,81	0,385	64,19	0,558
2	0,340	0,110	32,38	0,230	67,62	0,479
3	0,450	0,145	32,33	0,305	67,67	0,478
4	0,440	0,133	30,25	0,307	69,75	0,434
5	0,450	0,148	32,81	0,302	67,19	0,488
6	0,480	0,074	15,40	0,406	84,60	0,182
7	0,460	0,065	14,15	0,395	85,85	0,165
8	0,480	0,095	19,88	0,385	80,12	0,248
9	0,490	0,104	21,30	0,386	78,70	0,271
10	0,390	0,127	32,60	0,263	67,40	0,484
11	0,410	0,104	25,40	0,306	74,60	0,340
12	0,450	0,169	37,50	0,281	62,50	0,600
13	0,430	0,125	29,10	0,305	70,90	0,410
14	0,390	0,116	29,65	0,274	70,35	0,421
15	0,340	0,066	19,50	0,274	80,50	0,242
Mean	0,44	0,120	27,20	0,320	72,80	0,387
S.D.	0,064	0,040	7,43	0,056	7,43	0,137
S.E.	0,017	0,010	1,92	0,014	1,92	0,035
C.V., %	14,62	33,29	27,32	17,51	10,21	35,38

Таблица 29 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных из группы Б

Номер пациента	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
1	0,490	0,135	27,48	0,355	72,52	0,379
2	0,510	0,225	44,12	0,285	55,88	0,790
3	0,460	0,139	30,15	0,321	69,85	0,432
4	0,550	0,068	12,30	0,482	87,70	0,140
5	0,560	0,167	29,88	0,393	70,12	0,426
6	0,510	0,193	37,75	0,317	62,25	0,606
7	0,560	0,225	40,15	0,335	59,85	0,671
8	0,530	0,162	30,65	0,368	69,35	0,442
9	0,540	0,078	14,52	0,462	85,48	0,170
10	0,470	0,136	28,96	0,334	71,04	0,408
11	0,490	0,187	38,14	0,303	61,86	0,617
12	0,510	0,067	13,15	0,443	86,85	0,151
13	0,540	0,169	31,29	0,371	68,71	0,455

Продолжение Таблицы 29

14	0,530	0,251	47,41	0,279	52,59	0,902
15	0,510	0,052	10,11	0,458	89,89	0,112
16	0,560	0,136	24,30	0,424	75,70	0,321
17	0,520	0,190	36,54	0,330	63,46	0,576
Mean	0,52	0,152	29,23	0,368	70,77	0,447
S.D.	0,031	0,059	11,29	0,065	11,29	0,229
S.E.	0,008	0,015	2,91	0,017	2,91	0,059
C.V., %	5,86	40,06	39,81	17,27	15,76	53,39

Таблица 30 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных из группы В

Номер пациента	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
1	0,590	0,187	31,73	0,403	68,27	0,465
2	0,510	0,201	39,44	0,309	60,56	0,651
3	0,600	0,185	30,75	0,416	69,25	0,444
4	0,600	0,160	26,65	0,440	73,35	0,363
5	0,570	0,301	52,98	0,267	47,02	1,127
6	0,630	0,229	36,47	0,398	63,53	0,574
7	0,600	0,169	28,15	0,431	71,85	0,392
8	0,590	0,186	31,45	0,404	68,55	0,459
9	0,620	0,227	36,62	0,393	63,38	0,578
10	0,690	0,221	32,10	0,469	67,90	0,473
11	0,710	0,221	31,10	0,489	68,90	1,657
12	0,590	0,202	34,30	0,388	65,70	0,522
13	0,630	0,522	82,84	0,108	17,16	1,065
14	0,650	0,203	31,28	0,447	68,72	0,455
15	0,670	0,234	34,90	0,436	65,10	0,536
16	0,590	0,237	40,22	0,353	59,78	0,673
17	0,680	0,221	32,57	0,452	66,50	0,490
18	0,520	0,170	32,75	0,358	68,80	0,476
Mean	0,613	0,228	37,02	0,385	63,02	0,633
S.D.	0,054	0,069	9,45	0,063	9,472	0,33
S.E.	0,012	0,016	2,23	0,015	2,23	0,078
C.V., %	8,75	30,07	25,51	16,26	15,03	51,90

Таблица 31 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных из группы Г

Номер пациента	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
1	0,790	0,260	32,88	0,530	67,12	0,490
2	0,650	0,225	34,58	0,425	65,42	0,529
3	0,655	0,236	35,99	0,419	64,01	0,562
4	0,640	0,200	31,28	0,440	68,72	0,455
5	0,700	0,247	35,29	0,453	64,71	0,545
6	0,840	0,296	35,22	0,544	64,78	0,544
7	0,790	0,254	32,14	0,536	67,86	0,474
8	0,750	0,349	46,55	0,401	53,45	0,871
9	0,780	0,234	30,00	0,546	70,00	1,364
10	0,730	0,279	38,25	0,451	61,75	0,619
11	0,740	0,609	82,30	0,131	17,70	1,203
12	0,780	0,214	27,38	0,566	72,62	0,377
Mean	0,737	0,284	38,49	0,453	61,512	0,669
S.D.	0,064	0,078	9,45	0,078	9,454	0,313
S.E.	0,018	0,022	2,73	0,022	2,729	0,090
C.V., %	8,69	27,45	24,56	17,33	15,37	46,69

Для уточнения влияния амлодипина на эндогенный уровень CoQ10 и состояние его редокс-статуса был проведен сравнительный анализ значений концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных, получавших аторвастатин, бисопролол/метопролол и амлодипин (группа Б), а также пациентов, получавших препараты аторвастатин, бисопролол/метопролол (группа А).

Таблица 32 - Оценка влияния амлодипина на концентрации убихинона, убихинола, общего CoQ10 и редокс-статус

Параметр	Группа А (Контрольная группа)						Группа Б (Исследуемая группа)					
	СоQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус	СоQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%		мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
Mean	0,44	0,119	27,20	0,320	72,79	0,387	0,52*	0,152	29,22	0,368*	70,77	0,447
S.D.	0,064	0,039	7,432	0,056	7,432	0,1368	0,030	0,059	11,289	0,064	11,289	0,229
S.E.	0,012	0,010	1,919	0,014	1,919	0,035	0,007	0,0143	2,738	0,157	2,738	0,055
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,404	0,0976	23,088	0,2892	68,68	0,3109	0,5043	0,1213	23,425	0,3350	64,97	0,329
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,476	0,1419	31,32	0,3513	76,91	0,4825	0,5357	0,1822	35,034	0,402	76,575	0,564
Тест Колмогорова-Смирнова	0,1556 p>0,10	0,1065 p>0,10	0,1065 p>0,10	0,1065 p>0,10	0,1065 p>0,10	0,1677 p>0,10	0,1367 p>0,10	0,1533 p>0,10	0,1533 p>0,10	0,1533 p>0,10	0,2025 p>0,10	0,2025 p>0,10
t-тест Стьюдента	—	—	—	—	—	—	4,441 p<0,003	1,767 p=0,043	0,591 p=0,56	2,225 p=0,017	0,591 p=0,559	0,888 p=0,19

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой

Наблюдали статистически достоверное увеличение уровня убихинона и общего CoQ10, а также хотя и статистически недостоверные, но положительные изменения в динамике убихинола (+27,73 $\Delta\%$) и редокс-статуса (+15,50 $\Delta\%$). Соответственно, можно сделать следующий вывод: блокатор кальциевых каналов амлодипин не только действует синергически с CoQ10 при одновременном приеме, но и, возможно, способен в небольшой степени нивелировать отрицательное воздействие статинов и β -блокаторов на окислительно-восстановительный баланс организма. В литературе описана роль блокаторов кальциевых каналов в условиях оксидативного стресса. В первую очередь, они предотвращают снижение концентрации глутатиона, вызванное окислительным стрессом. Также отмечалось, что блокаторы кальциевых каналов предотвращают нарушения синтеза простациклинов, характерных окислительному стрессу.

Для анализа действия аторвастатина (статины) на эндогенную концентрацию убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статус, сравнивали уровни общего CoQ10 у больных, получавших аторвастатин (статины), бисопролол/метопролол (β -блокаторы), амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа Б) и пациентов, по бисопролол/метопролол (β -блокаторы), а также амлодипин (блокатор кальциевых каналов) (группа В)

При сравнении групп пациентов Б и В, среднее значение концентрации убихинола (-33,3 $\Delta\%$), общего CoQ10 (-15,17 $\Delta\%$), а также процентное содержание убихинола и убихинона в группе Б были достоверно ниже, чем в группе В. Результаты проведенного непарного двухвыборочного t-теста Стьюдента, представленные в Таблице 33, свидетельствуют, что на концентрацию как CoQ10, так и его восстановленной формы в плазме крови (даже в большей степени) влияет аторвастатин, который значительно снижает значения их эндогенной концентрации. Согласно литературным данным статины ингибируют фермент ГМГ-КоА-редуктазу, что одновременно с синтезом холестерина нарушает и синтез CoQ10. На Рисунках 30 и 31 представлены хроматограммы, иллюстрирующие концентрации убихинона, убихинола и общего CoQ10 у пациента из группы А.

Таблица 33 - Оценка влияния аторвастатина на концентрации убихинона, убихинола, общего CoQ10 и редокс-статус

Параметр	Группа В (Контрольная группа)						Группа Б (Изучаемая группа)					
	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%		мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
Mean	0,613	0,228	37,02	0,385	63,02	0,633	0,52*	0,152*	29,23*	0,368	70,77*	0,447
S.D.	0,053	0,069	9,446	0,062	9,472	0,3287	0,030	0,059	11,289	0,064	11,289	0,229
S.E.	0,013	0,016	2,227	0,014	2,233	0,077	0,007	0,0143	2,738	0,157	2,738	0,055
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,588	0,1937	32,319	0,3542	58,307	0,4698	0,504	0,1213	23,425	0,3350	64,966	0,3292
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,64	0,262	41,715	0,4165	67,728	0,7968	0,5357	0,1822	35,034	0,4015	76,575	0,5647
Тест Колмогорова-Смирнова	0,1649 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2882 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,1367 p>0,10	0,2882 p>0,10	0,2882 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2882 p>0,10	0,2882 p>0,10
t-тест Стьюдента	—	—	—	—	—	—	6,276 p<0,0001	3,502 p=0,001	2,218 p=0,035	0,794 p=0,432	2,206 p=0,035	1,935 p=0,062

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой

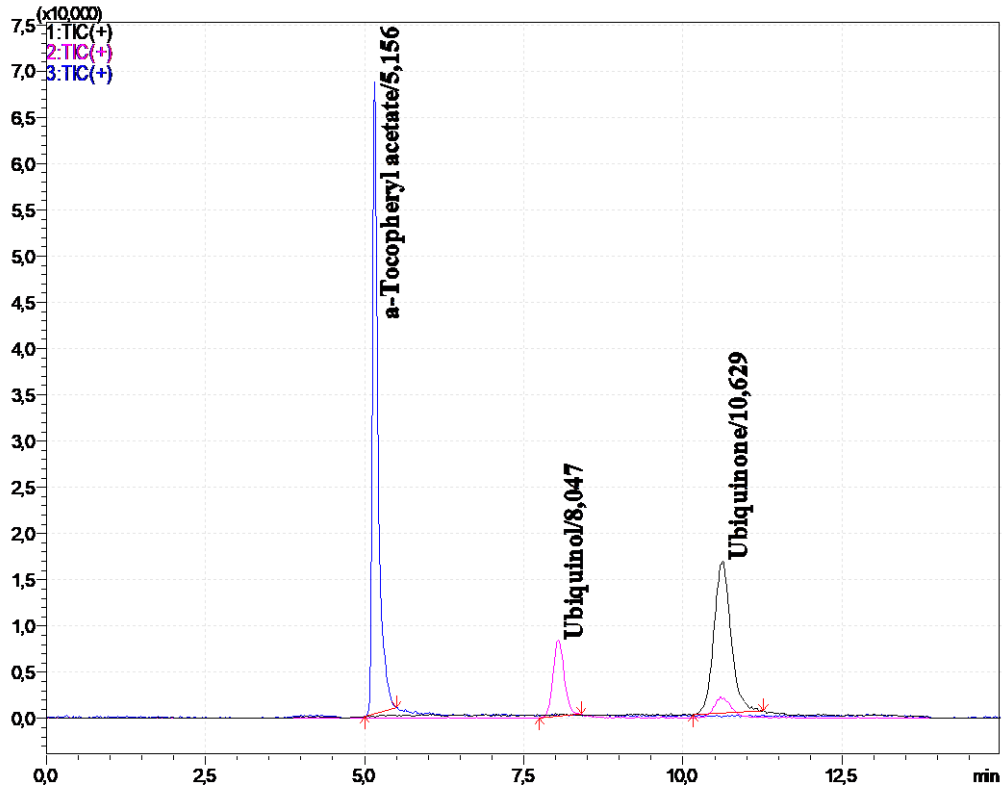


Рисунок 30 - Концентрация убинола и убинона на хроматограмме плазмы крови пациента из группы А со стабилизацией убинола

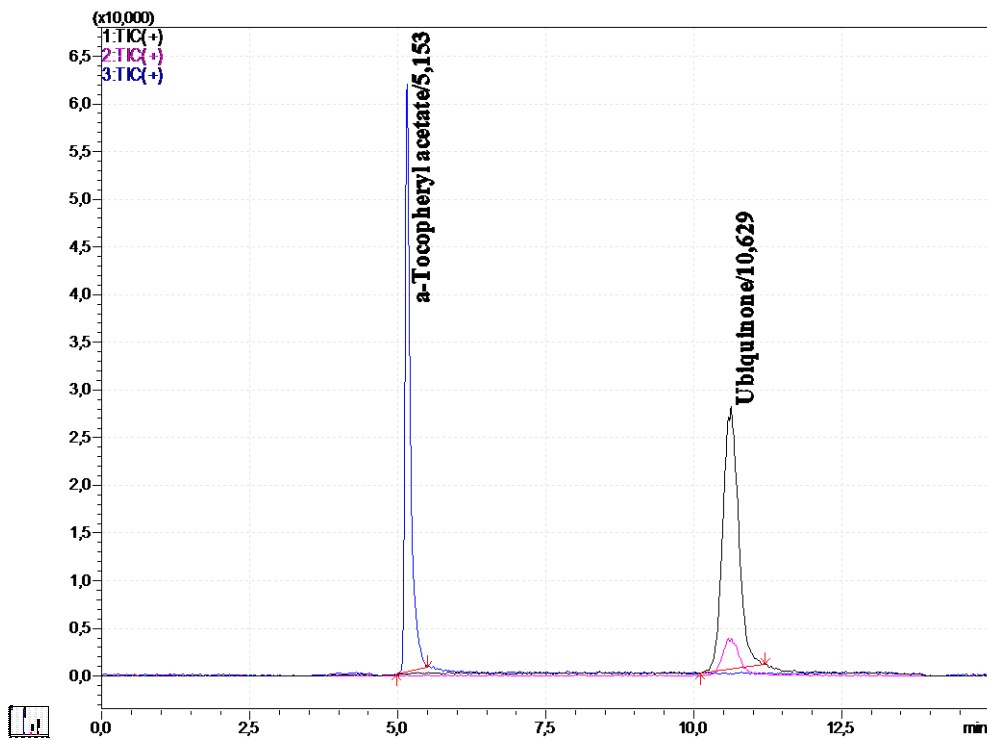


Рисунок 31 - Концентрация общего CoQ10 на хроматограмме плазмы крови пациента из группы А после окисления убинола

Для оценки влияния антиоксиданта этоксидола на эндогенный уровень

убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса проводили сравнительный анализ их концентрации у больных (группа Г), получавших этоксидол (антиоксидант), биспролол/метопролол (β -блокаторы), амлодипин (блокатор кальциевых каналов), и пациентов (группа В), получавших биспролол/метопролол (β -блокаторы) и амлодипин (блокатор кальциевых каналов).

При сравнении среднего уровня убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса у пациентов, принимавших препараты из группы В и группы Г, можно сделать вывод, что у группы Г средняя концентрация убихинона, убихинола, а также общего CoQ10 статистически значимо выше, чем у группы В. Также отмечается тенденция увеличения процентного содержания убихинола и понижения процентного содержания убихинона. Были выявлены статистически значимые различия между группами В и Г.

Согласно полученным результатам, при приёме антиоксиданта этоксидола во время лечения блокаторами кальциевых каналов и бета-блокаторами наблюдается не только статистически достоверный рост концентрации убихинола и общего CoQ10 в плазме крови, но также положительная динамика редокс-статуса CoQ10. Этот факт может быть объяснен способностью антиоксидантов поглощать активные формы кислорода (АФК) и останавливать радикальные цепные реакции, что подразумевает меньший расход CoQ10. Вследствие этого, возможно, следует включать в фармакотерапию больным сердечно-сосудистыми заболеваниями препаратов, содержащих антиоксиданты для облегчения борьбы с окислительным стрессом или препаратов CoQ10, которые будут предупреждать такие последствия оксидативного стресса, как истощение АТФ и последующее разрушение клеток.

Таблица 34 – Оценка влияния этоксида на концентрации убихинона, убихинола, общего CoQ10 и редокс-статус

Параметр	Группа В (Контрольная группа)						Группа Г (Исучаемая группа)					
	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус	CoQ10	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%		мкг/мл	мкг/мл	%	мкг/мл	%	
Mean	0,613	0,228	37,02	0,385	63,02	0,633	0,737*	0,285*	38,49	0,453*	61,52	0,669
S.D.	0,053	0,069	9,446	0,062	9,472	0,3287	0,063	0,078	9,454	0,078	9,454	0,313
S.E.	0,013	0,016	2,227	0,014	2,233	0,077	0,018	0,022	2,729	0,023	2,729	0,090
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,588	0,1937	32,319	0,3542	58,307	0,4698	0,697	0,2349	32,481	0,4028	55,505	0,4708
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,64	0,2619	41,715	0,4165	67,728	0,7968	0,777	0,3341	44,495	0,5024	67,519	0,8980
Тест Колмогорова-Смирнова	0,1649 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2802 p>0,10	0,2884 p>0,10	0,1648 p>0,10	0,2884 p>0,10	0,2884 p>0,10	0,2884 p>0,10	0,2884 p>0,10	0,2802 p>0,10
t-тест Стьюдента	–	–	–	–	–	–	5,730 p<0,0001	2,099 p=0,045	0,418 p=0,679	2,606 p=0,015	0,427 p=0,673	0,300 p=0,766

Примечание:* - статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой

Сравнение полученных результатов для всех четырех групп было выполнено при помощи дисперсионного анализа ANOVA. В ходе анализа проверялась нулевая гипотеза о равенстве средних. F-критерий Фишера превышал критическое значение, вследствие чего нулевая гипотеза отвергалась и принималась альтернативная гипотеза о различии (неравенстве) средних. Различия средних, вычисленные при помощи теста Тьюки-Крамера, представлены в Таблице 35, Таблице 36 и на Рисунке 32. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

В первом столбце Таблицы 35 и Таблицы 36 перечислены пары сравниваемых групп. Во втором столбце представлены разницы между соответствующими групповыми средними. Как можно наблюдать из полученных данных, содержание общего CoQ10 в плазме крови значительно отличается в представленных четырёх группах. Значения p для всех столбцов не превышают 0,01, что и свидетельствует о существенных статистических различиях между сравниваемыми парами.

Значения эндогенной концентрации убихинола статистически достоверно отличались между пациентами из групп А и В, А и Г, а также между пациентами из групп Б и В, и Б и Г. Концентрация убихинон значимо различалась у пациентов из групп А и В, А и Г, а также Б и Г. Не было отмечено достоверных различий редокс-статуса CoQ10 у анализируемых групп.

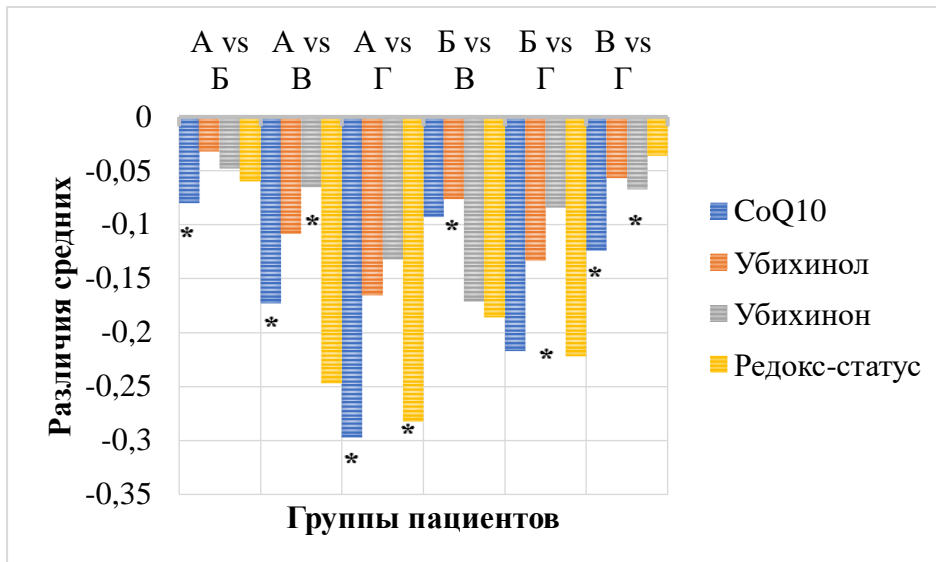


Рисунок 32 - Различия средних значений убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса (* - статистически достоверные различия)

Таблица 35 - Сравнение средних значений убихинона и убихинола, методом ANOVA с применением апостериорного теста Тьюки-Крамера

Группы	Убихинон			Убихинол		
	MD	t	p-значение	MD	t	p-значение
A vs Б	-0,048	2,082	p>0,05	-0,032	1,450	p>0,05
A vs В	-0,065	2,861	p<0,05	-0,108	4,960	p<0,001
A vs Г	-0,132	5,252	p<0,001	-0,165	6,824	p<0,001
Б vs В	-0,171	0,777	p>0,05	-0,076	3,608	p<0,01
Б vs Г	-0,084	3,439	p<0,01	-0,133	5,647	p<0,001
В vs Г	-0,067	2,774	p<0,05	-0,057	2,439	p>0,05

Примечание: MD - различия средних, vs – по сравнению.

Таблица 36 - Сравнение средних значений общего CoQ10 и его редокс-статуса методом ANOVA с применением апостериорного теста Тьюки-Крамера

Группы	CoQ10			Редокс-статус		
	MD	t	p-значение	MD	t	p-значение
A vs Б	-0,080	4,208	p<0,001	-0,060	0,647	p>0,05
A vs В	-0,173	9,239	p<0,001	-0,247	2,682	p>0,05
A vs Г	-0,297	14,294	p<0,001	-0,283	2,775	p>0,05
Б vs В	-0,093	5,143	p<0,001	-0,186	2,095	p>0,05
Б vs Г	-0,217	0,729	p<0,001	-0,222	2,243	p>0,05
В vs Г	-0,124	6,188	p<0,001	-0,036	0,368	p>0,05

Примечание: MD - различия средних, vs – по сравнению.

Сравнение среднего уровня общего CoQ10 и динамика изменения

концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и редокс-статуса в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, применяющих различную терапию, по сравнению с практически здоровыми лицами представлены в Таблице 37 и на Рисунках 33, 34.

Таблица 37 - Усредненные концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных при приеме лекарственных средств из различных фармакологических групп

Параметр	Группа А	Группа Б	Группа В	Группа Г
n	15	17	18	12
Mean	0,44*	0,52*	0,613*	0,737*
S.D.	0,064	0,030	0,053	0,063
S.E.	0,0116	0,0074	0,0126	0,018
S.V., %	14,64	5,89	8,73	8,62
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,4049	0,5043	0,5867	0,697
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,4764	0,5357	0,64	0,777

Примечание: * – статистически достоверные различия между группами

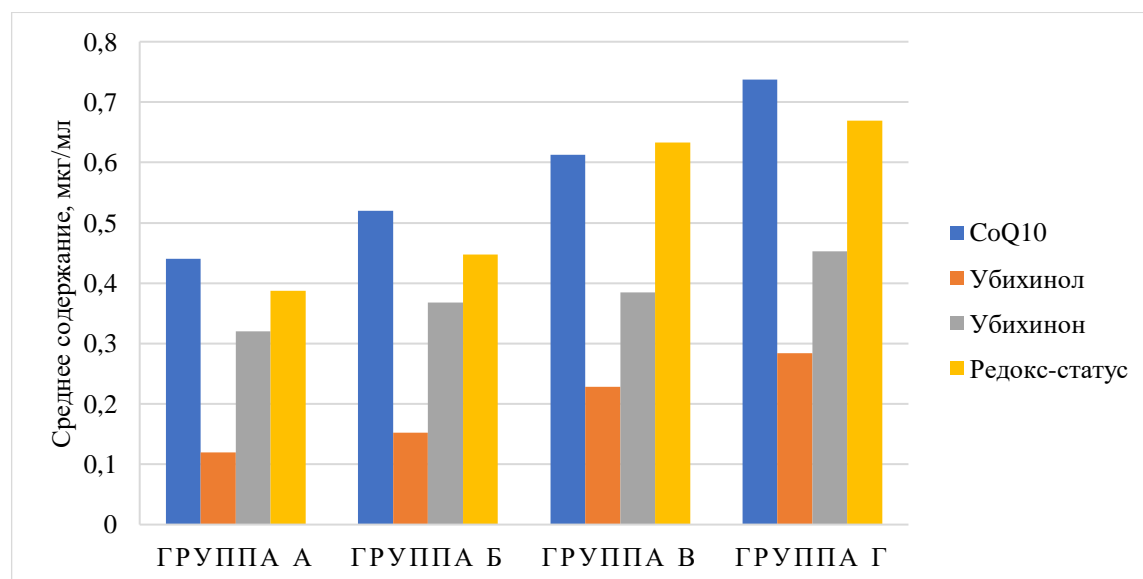


Рисунок 33 - Сравнение среднего уровня убихинола, убихинона, общего CoQ₁₀ и его редокс-статуса в плазме крови больных первой группы, применяющих различную терапию

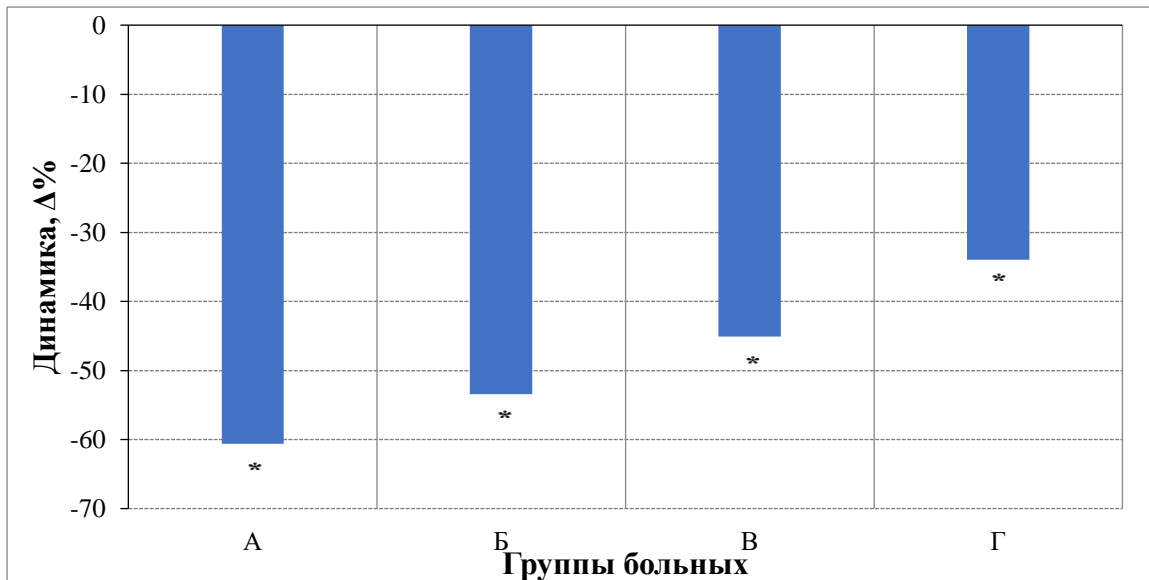


Рисунок 34 - Динамика плазменной концентрации общего CoQ10 у разных групп больных первой группы по сравнению с практически здоровыми лицами (* - статистически достоверные различия)

Таким образом, у больных ХСН, ИБС и АГ на фоне лечения различными лекарственными средствами эндогенная плазменная концентрация убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус статистически достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц. Установлено, что прием аторвастатина (статины) статистически достоверно снижает эндогенную концентрацию убихинола, общего CoQ10 и процентное содержание убихинола, а также достоверно повышает процентное содержание убихинона в плазме крови больных. При этом наблюдается тенденция снижения редокс-статуса CoQ10 на фоне приема аторвастатина (-29,4 Δ%), хотя и статически недостоверная. По-видимому, выявленные изменения связаны с тем, что препараты данной группы ингибируют ГМГ-КоА-редуктазу, и таким образом снижают синтез не только холестерина, но и синтез CoQ10.

При добавлении в терапию амлодипина (блокатор кальциевых каналов) у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями наблюдается положительное статистически достоверное влияние на общую концентрацию CoQ10 за счет статистически достоверного повышения концентрации убихинона (+15,0 Δ%) и в большей степени за счет повышения концентрации убихинола (+27,7 Δ%), хотя и статистически недостоверного. На фоне приема амлодипина наблюдается

тенденция (статически недостоверная) повышения редокс-статуса CoQ10 (+15,5 $\Delta\%$). Выявленные особенности могут быть обусловлены предотвращением снижения уровня глутатиона, а также нарушений синтеза простациклинов.

При назначении этоксида (антиоксидант) у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями статистически достоверно увеличивается не только концентрация убихинола, убихинона и общего CoQ10, но и наблюдается незначительная положительная динамика значения редокс-статуса CoQ10 (+5,7 $\Delta\%$), что может быть обусловлено усилением общей антиоксидантной защиты [184] и меньшим потреблением CoQ10.

4.4. Выводы по главе

1. Установлено, что у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (ХСН, ИБС и АГ) концентрация эндогенного общего CoQ10 статистически достоверно ниже (-49,0 $\Delta\%$), чем у практически здоровых лиц.

2. Определена эндогенная концентрация убихинола и убихинона в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, рассчитан редокс-статус CoQ10, при этом выявлено, что эндогенные концентрации CoQ10 у больных I группы ниже, чем у практически здоровых лиц, а концентрации убихинона и убихинола и редокс-статус CoQ10 у больных I группы значительно ниже литературных данных у здоровых лиц.

3. Выявлено, что у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями на фоне стандартной терапии резко изменяется баланс убихинола и убихинона в сторону окисленной формы (32,79:67,21) по сравнению с практически здоровыми лицами (95:5), что указывает на повышенное потребление убихинола в связи с усилением окислительного стресса и накоплением окислителей в организме больных.

5. Доказано, что при добавлении в терапию больным сердечно-сосудистыми заболеваниями амлодипина (блокатора кальциевых каналов) статистически достоверно увеличивается концентрация общего CoQ10 (+18,2 $\Delta\%$) и убихинона

(+15,0 $\Delta\%$), наблюдается тенденция повышения концентрации убихинола (+27,7 $\Delta\%$) и редокс-статуса (+15,5 $\Delta\%$). Наблюдаемые изменения могут быть связаны с предотвращением уменьшения уровня глутатиона, а также нарушения синтеза простаглицинов под действием амлодипина.

6. Установлено, что прием аторвастатина (статины) статистически значимо снижает эндогенную концентрацию убихинола (-33,3 $\Delta\%$) и общего CoQ10 (-15,2 $\Delta\%$), а также приводит к незначительному снижению концентрации убихинона (-4,4 $\Delta\%$) и умеренному снижению редокс-статуса (-29,4 $\Delta\%$) в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Это может быть обусловлено способностью статинов ингибировать ГМГ-КоА-редуктазу, что предотвращает не только синтез холестерина, но и синтез CoQ10.

7. Показано, что при введении этоксида (антиоксидант) в терапию больным сердечно-сосудистыми заболеваниями, статистически достоверно увеличивается концентрация убихинола (+25,0 $\Delta\%$), убихинона (+17,7 $\Delta\%$) и общего CoQ10 (+20,2 $\Delta\%$), наблюдается тенденция повышения редокс-статуса (+5,7 $\Delta\%$), что, по-видимому, обусловлено усилением общей антиоксидантной защиты организма и меньшим потреблением CoQ10. Вследствие этого, оправдано добавление этоксида к терапии больным сердечно-сосудистыми заболеваниями, как препарата, борющегося с одной из основных причин ХСН – окислительным стрессом.

**ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ КУДЕСАНА® НА ПЛАЗМЕННЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ
УБИХИНОНА, УБИХИНОЛА, ОБЩЕГО CoQ10 И ЕГО РЕДОКС-СТАТУС
У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА,
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ (0-I ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КЛАСС ПО NYHA)**

Для оценки влияния Кудесана® в составе стандартной терапии на плазменные уровни убихинола, убихинона и общего CoQ10 больные ишемической болезнью сердца (ИБС), артериальной гипертензией (АГ) и хронической сердечной недостаточностью 0-I ФК (по NYHA) были распределены на две группы – контрольную (получала стандартную терапию) и тестируемую (получала дополнительно к стандартной терапии Кудесан®). Концентрацию убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови больных обеих групп измеряли дважды: на 2 день стандартной терапии в стационаре (исход) и через 14 дней лечения.

**5.1. Содержание убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статус в
плазме крови больных ишемической болезнью сердца, артериальной
гипертензией и 0-I ФК ХСН на фоне стандартной терапии**

Индивидуальные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных контрольной группы, принимающих стандартную терапию, до и через 14 дней лечения представлены в Таблице 38, а результаты их статистической обработки приведены в Таблице 40.

Таблица 38 – Индивидуальные значения концентраций общего CoQ10 в плазме крови больных контрольной группы (мкг/мл)

№ пациента/ Параметр	Исход	14 дней лечения
1.	0,84	0,85
2.	0,41	0,46
3.	0,61	0,40

Продолжение Таблицы 38

4.	0,88	1,02
5.	0,94	0,98
6.	0,97	0,88
7.	0,40	0,58
8.	1,09	1,15
9.	0,45	0,83
10.	0,67	0,72
11.	0,95	0,85
12.	0,69	0,69
Mean	0,741	0,784
t-тест Стьюдента	0,982	
F	11	

Согласно тесту Колмогорова-Смирнова, выборка подчинялась нормальному распределению. При проведении парного двухвыборочного t-теста Стьюдента не было отмечено статистически значимых отличий в контрольной группе до и после лечения, $p = 0,347$, соответственно, значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови значимо не различались.

Сравнивая полученные концентрации общего CoQ10 у практически здоровых лиц и больных ИБС и АГ контрольной группы (Таблица 39) следует отметить, что у больных наблюдалось статистически достоверное снижение концентрации общего CoQ10 как в исходе (в среднем $-33\Delta\%$), так и после 14 дней лечения (в среднем $-29\Delta\%$). При этом, у больных на фоне стандартной терапии по сравнению с исходом наблюдалось незначительное увеличение концентрации общего CoQ10, который по-прежнему был статистически достоверно ниже, чем у здоровых лиц.

Таблица 39 - Усредненные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных контрольной группы и практически здоровых лиц

Параметр	Контрольная группа		Практически здоровые лица
	Исход	14 дней лечения	
n	12	12	54
Mean	0,741*	0,784*	1,116
S.D.	0,237	0,224	0,423
S.E.	0,068	0,064	0,057
S.V., %	32,06	28,65	37,91
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,590	0,641	1,001
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,892	0,926	1,223
Тест Колмогорова-Смирнова	0,1604 P > 0,10	0,1642 P > 0,10	0,301 P = 0,0001
Тест Манна Уитни U'	556,5 P = 0,0001	543 P = 0,0003	-

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с группой практически здоровых лиц

При анализе значений концентраций убихинола, убихинона и редокс-статуса у больных контрольной группы в исходе и на фоне стандартной терапии не было выявлено статистически значимых различий. Обе группы данных подчинялись нормальному распределению Гаусса, что было доказано при помощи теста Колмогорова-Смирнова, поэтому был проведен парный двухвыборочный t-тест Стьюдента, результаты которого представлены в Таблице 39. Также наблюдалось незначительное увеличение концентрации убихинола и снижение концентрации убихинона, и умеренное увеличение редокс-статуса, что может быть связано с особенностями механизма действия применяемых препаратов.

Выявленное у больных ИБС и АГ в исходе статистически достоверное снижение концентрации общего CoQ10 по сравнению с группой практически здоровых лиц, а также снижение уровня убихинола, убихинона и редокс-статуса по сравнению с литературными данными у здоровых добровольцев, могут свидетельствовать об окислительном стрессе, вызванном в организме

патогенетическими механизмами ИБС и АГ, поскольку известно, что в патофизиологии ИБС большую роль играют NOX (НАДФН – оксидазы) – трансмембранные белки, которые переносят электрон от НАДФН к молекулярному кислороду, таким образом, являясь механизмом выработки супероксида. Побочной реакцией в этой цепи является высвобождение АФК, что также называется «окислительным взрывом». В свою очередь выработка АФК приводит к снижению концентрации NO, который, обладая антитромботическими, противовоспалительными и сосудорасширяющими свойствами, играет одну из ключевых ролей в эндогенной антиоксидантной защите организма. АФК влияет и на синтазы оксида азота (eNOS), порождая дефицит кофакторов для eNOS, и на неправильную активацию из-за нарушения клеточной передачи сигналов, тем самым не только уменьшая биодоступность NO, но и «переключая» деятельность семейства eNOS с производства оксида азота на выработку супероксида и пероксида [185].

Индивидуальные значения концентрации убихинола, убихинона и редокс-статуса CoQ10 в плазме крови больных контрольной группы в исходе и через 14 дней стандартной терапии представлены в Таблице 40.

Таким образом, у больных ИБС и АГ выявлено статистически достоверное снижение плазменной концентрации общего CoQ10 по сравнению с практически здоровыми лицами как в исходе, так и на фоне стандартной терапии, а редокс-статус – значительно ниже по сравнению с литературными данными у здоровых добровольцев.

Таблица 40 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола и редокс-статуса в плазме крови больных контрольной группы (стандартная терапия)

N пациента/ Параметр	Исход					14 дней лечения				
	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	% ^A	мкг/мл	% ^A		мкг/мл	% ^A	мкг/мл	% ^A	
1.	0,72	85,71	0,12	14,29	6,00	0,54	63,53	0,31	36,47	1,74
2.	0,29	73,17	0,12	26,83	2,73	0,19	41,30	0,27	58,70	0,70
3.	0,44	72,13	0,17	27,87	2,59	0,28	70,00	0,12	30,00	2,33
4.	0,27	30,68	0,61	69,32	0,44	0,89	87,25	0,13	12,75	6,85
5.	0,74	78,72	0,2	21,28	3,70	0,84	85,71	0,14	14,29	6,00
6.	0,59	60,82	0,38	39,18	1,55	0,66	75,00	0,22	25,00	3,00
7.	0,29	72,50	0,11	27,50	2,64	0,45	77,59	0,13	22,41	3,46
8.	0,49	44,95	0,6	55,05	0,82	0,55	47,83	0,6	52,18	0,92
9.	0,38	84,44	0,07	15,56	5,43	0,69	83,13	0,14	16,87	4,93
10.	0,49	73,13	0,18	26,87	2,72	0,51	70,83	0,21	29,17	2,43
11.	0,71	74,74	0,24	25,26	2,96	0,66	77,65	0,19	22,35	3,47
12.	0,41	59,42	0,28	40,58	1,46	0,43	62,32	0,26	37,68	1,65
Mean	0,485	67,53	0,256	32,47	2,753	0,558	70,18	0,227	29,82	3,123
S.D.	0,170	16,18	0,184	16,18	1,676	0,207	14,38	0,134	14,38	1,945
S.E.	0,049	4,672	0,053	4,672	0,483	0,060	4,15	0,039	4,15	0,561
C.V., %	35,06	23,96	71,87	49,85	60,85	37,13	20,49	58,90	48,22	62,21
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,378	57,25	0,139	22,18	1,689	0,426	61,04	0,142	20,67	1,888
Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,594	77,81	0,373	42,75	3,818	0,689	79,31	0,312	38,96	4,359

Продолжение Таблицы 40

Тест Колмогорова-Смирнова	0,157	0,278	0,202	0,278	0,200	0,137	0,178	0,292	0,206	0,179
t-тест Стьюдента						1,141 P=0,278	0,432 P=0,674	0,610 P=0,554	0,432 P=0,674	0,5063 P=0,623

Примечание: редокс-статус – отношение концентрации убихинола к концентрации убихинона, ^A – в % от концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных.

5.2. Особенности содержания убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и 0-I ФК ХСН, получавших в составе стандартной терапии Кудесан®

Индивидуальные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных тестируемой группы, принимающих в составе стандартной терапии Кудесан®, до и через 14 дней лечения представлены в Таблице 41, а результаты их статистической обработки – в Таблице 43.

При проведении статистического анализа полученных данных у больных тестируемой группы в исходе и на фоне лечения были выявлены статистически значимые различия в концентрациях убихинола, убихинона, общего CoQ10 и редокс-статуса. Обе группы данных согласно результатам теста Колмогорова-Смирнова подчинялись нормальному распределению Гаусса. Результаты парного двухвыборочного t-теста Стьюдента приведены в Таблицах 41 и 43.

Таблица 41 - Индивидуальные значения концентраций общего CoQ10 в плазме крови больных тестируемой группы (мкг/мл)

№ пациента/ Параметр	Исход	14 дней лечения
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
1.	1,18	1,28
2.	0,89	1,07
3.	0,75	0,71
4.	0,40	0,68
5.	0,97	1,31
6.	0,51	0,89
7.	0,77	0,7
8.	0,70	1,06
9.	0,89	1,28
10.	0,54	0,79
11.	0,51	0,74
12.	0,99	1,24

Продолжение Таблицы 41

13.	0,62	0,71
14.	1,10	1,27
Mean	0,772	0,980*
t-тест Стьюдента	5,308	
F	13	

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с исходом

Отмечены статистически значимые различия в значениях концентрации общего СоQ10 в тестируемой группе до лечения и на 14 день лечения ($p < 0,001$).

При сравнении концентрации общего СоQ10 у практически здоровых лиц и больных тестируемой группы (Таблица 42) было обнаружено, что у больных наблюдалось статистически достоверное снижение концентрации общего СоQ10 исходе (-30,82 $\Delta\%$). Однако на фоне лечения концентрация общего СоQ10 статистически достоверно повышалась (+27 $\Delta\%$) и достоверно не отличалась от таковой у здоровых лиц.

Таблица 42 - Усредненные значения общего СоQ10 в плазме крови больных тестируемой группы и у практически здоровых лиц

Параметр	Тестируемая группа		Практически здоровые лица
	Исход	14 дней лечения	
n	14	14	54
Mean	0,772 ^{1,2}	0,980	1,116
S.D.	0,239	0,258	0,423
S.E.	0,064	0,0691	0,057
S.V., %	31,01%	26,39%	37,91
Нижняя граница 95% доверительного интервала	0,634	0,831	1,001
Верхняя граница 95% дов. интервала	0,911	1,130	1,223

Продолжение Таблицы 42

Тест Колмогорова- Смирнова	0,1604 P > 0,10	0,1642 P > 0,10	0,301 P = 0.0001
Тест Манна Уитни U'	556,5 P = 0.0001	543 P = 0,0003	-

Примечание: ¹ – статистически достоверные различия по сравнению с практически здоровыми лицами, ² – статистически достоверные различия по сравнению с тестируемой группой на фоне лечения.

Индивидуальные значения концентрации убихинола, убихинона и редокс-статуса CoQ10 в плазме крови больных тестируемой группы в исходе и через 14 дней лечения представлены в Таблице 43.

Согласно полученным данным, наблюдалось статистически достоверное значительное увеличение концентрации убихинола, резкое увеличение редокс-статуса и умеренное снижение концентрации убихинона через 14 дней лечения стандартной терапией и Кудесаном[®]. Следует отметить, что у больных тестируемой группы уже через 14 дней лечения не только концентрация общего CoQ10 достоверно не отличалась от таковой у практически здоровых лиц (-12Δ%), но и среднее значение соотношения уровней убихинола и убихинона (81/19) приблизилось к таковому у здоровых лиц (87/13) в исследовании [17], при этом еще существенно отличалось от средних значений у здоровых лиц (95/5) [18,23]. Представленные данные свидетельствуют о достаточно высоком антиоксидантном потенциале назначенного лекарственного препарата Кудесан[®], который обусловлен особенностями его лекарственной формы: абсолютная биодоступность солюбилизированной формы коэнзима Q10 значительно выше, чем твердых лекарственных форм [186,187].

Таблица 43 - Индивидуальные значения концентрации убихинона, убихинола и редокс-статуса в плазме крови больных тестируемой группы (стандартная терапия + Кудесан®)

N/ Параметр	Исход					14 дней лечения				
	Убихинол		Убихинон		Редокс- статус	Убихинол		Убихинон		Редокс-статус
	мкг/мл	% ^A	мкг/мл	% ^A		мкг/мл	% ^A	мкг/мл	% ^A	
1.	0,54	45,76	0,64	54,24	0,84	0,71	55,47	0,57	44,53	1,25
2.	0,44	49,44	0,45	50,56	0,98	0,81	75,70	0,26	24,30	3,12
3.	0,65	86,67	0,1	13,33	6,50	0,6	84,51	0,11	15,49	5,45
4.	0,28	70,00	0,12	30,00	2,33	0,55	80,88	0,13	19,12	4,23
5.	0,65	67,01	0,32	32,99	2,03	1,19	90,84	0,12	9,16	9,92
6.	0,33	64,71	0,18	35,29	1,83	0,71	79,78	0,18	20,22	3,94
7.	0,61	79,22	0,16	20,78	3,81	0,55	78,57	0,15	21,43	3,67
8.	0,58	82,86	0,12	17,14	4,83	0,81	76,42	0,25	23,58	3,24
9.	0,7	78,65	0,19	21,35	3,68	1,15	89,84	0,13	10,16	8,85
10.	0,29	53,70	0,25	46,30	1,16	0,65	82,28	0,14	17,72	4,64
11.	0,33	64,71	0,18	35,29	1,83	0,54	72,97	0,2	27,03	2,70
12.	0,78	78,79	0,21	21,21	3,71	1,1	88,71	0,14	11,29	7,86
13.	0,22	35,48	0,4	64,52	0,55	0,65	91,55	0,06	8,45	10,83
14.	0,89	80,91	0,21	19,09	4,24	1,17	92,13	0,1	7,87	11,70
Mean	0,521	66,99	0,252	33,01	2,737	0,799*	81,40*	0,181	18,60*	5,814*
S.D.	0,208	15,70	0,152	15,72	1,755	0,247	9,82	0,124	9,82	3,358
S.E.	0,056	4,197	0,040	4,20	0,469	0,066	2,63	0,033	2,625	0,897
C.V., %	39,93	23,44	60,29	47,57	64,09	30,95	12,07	68,74	52,81	57,77
Нижняя граница 95% дов. интервала	0,400	57,93	0,164	23,94	1,724	0,657	75,73	0,109	12,93	3,876

Продолжение Таблицы 43

Верхняя граница 95% доверительного интервала	0,641	76,06	0,340	42,07	3,750	0,942	87,07	0,253	24,27	7,753
Тест Колмогорова-Смирнова	0,178	0,199	0,252	0,199	0,163	0,212	0,137	0,242	0,137	0,208
t-тест Стьюдента						6,024 P < 0,0001	3,428 P = 0,005	2,268 P = 0,041	3,428 P = 0,005	3,239 P = 0,0065

Примечание: редокс-статус – отношение концентрации убихинола к концентрации убихинона, ^A – в % от концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных, * - статистически достоверные различия по сравнению с исходом

Результаты проведенного сравнительного анализа значений концентрации общего СоQ10 в плазме крови больных контрольной и тестируемой групп приведены в Таблице 44, а динамика изменения уровней убихинола, убихинона, общего СоQ10 и редокс-статуса у больных тестируемой группы, выраженная в $\Delta\%$ по сравнению с контрольной группой, представлена на Рисунке 36Б.

Установлено, что в исходе у больных контрольной и тестируемой групп не выявлено статистически достоверных различий, однако на фоне лечения концентрация убихинола, общего СоQ10 и редокс-статус были статистически достоверно выше у больных тестируемой группы.

На фоне лечения у больных из тестируемой группы по сравнению с контрольной группой были статистически достоверно выше уровни убихинола и общего СоQ10, статистически достоверно ниже уровень убихинона и резко возрастал редокс-статус (Рисунок 2Б). Иными словами, уровень общего СоQ10 значимо увеличивался за счет его восстановленной формы – убихинола.

Таблица 44 - Результаты статистического анализа значений концентрации общего СоQ10 в плазме крови больных контрольной и тестируемой групп

Параметр	Контрольная группа		Тестируемая группа	
	Исход	14 дней лечения	Исход	14 дней лечения
n	12	12	14	14
Mean	0,742 ^{1,2}	0,784 ^{1,2}	0,773 ^{1,2}	0,981 ^{3,4}
S.D.	0,238	0,225	0,240	0,259
S.E.	0,069	0,065	0,064	0,0692
C.V., %	32,06%	28,65%	31,01%	26,39%
D.I.	0,591	0,641	0,635	0,831
	0,893	0,926	0,911	1,130
Тест Колмогорова-Смирнова	0,2520	0,1642	0,1200	0,1989
	P > 0,10	P > 0,10	P > 0,10	P > 0,10
t-тест Стьюдента (с коррекцией Уэлча)	2.436 ^{ЛТ} P = 0,022	2.073 ^{ЛТ} P = 0,049	5,308 ^{ЛТ} P = 0,0001	5,308 ^{ИТ} P = 0,0001
				2.073 ^{ЛК} P = 0,049
				2.436 ^{ИК} P = 0,022

Примечание: ¹ – статистически достоверные различия по сравнению с тестируемой группой на фоне лечения, ² – статистически достоверные различия по сравнению с тестируемой группой в исходе, ³ – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой на фоне лечения, ⁴ – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой в исходе, ^{ИТ} – в сравнении с тестируемой группой в исходе, ^{ЛТ} – в сравнении с тестируемой группой на фоне лечения, ^{ИК} – в сравнении с контрольной группой в исходе, ^{ЛК} – в сравнении с контрольной группой на фоне лечения.

Выявленные статистически достоверные различия у больных тестируемой группы на фоне лечения по сравнению с контрольной группой на фоне стандартной терапии обусловлены дополнительным назначением к стандартной терапии лекарственного препарата, содержащего коэнзим Q10.

Антиоксидантные свойства CoQ10 и его расположение в центре образования свободных радикалов в митохондриях делают его очевидным кандидатом на роль потенциального терапевтического средства при сердечно-сосудистых заболеваниях [188]. Он также смягчает ишемические проявления в миокарде за счет улучшения коронарной вазодилатации. Кроме того, CoQ10 снижает скорость инактивации азота до пероксинитрита, осуществляемую анионами супероксида в условиях сильного оксидативного стресса. В некоторых исследованиях было отмечено, что пациенты с более низким уровнем супероксиддисмутазы (ecSOD) демонстрируют более значительные улучшения, чем пациенты с нормальным уровнем ecSOD. Это позволяет предположить, что чем выше оксидативный стресс, тем больше улучшение эндотелий-зависимой релаксации после применения CoQ10 [189]. CoQ10 также косвенно влияет на функцию сосудов через ингибирование оксидативного повреждения ЛПНП [100] за счет активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК), которая активирует путь Akt/eNOS/NO, и подавляет протеинкиназа С (PKC) - опосредованную активацию NOX в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) [66]. Добавление в терапию коэнзима Q10 у пациентов пожилого возраста приводило к подавлению ксантинооксидазного пути выработки АФК. Согласно механизму действия для того, чтобы проявить антиоксидантную активность убихинон должен быть

практически полностью восстановлен до убихинола чтобы тормозить процесс образования липидных пероксильных радикалов [190].

Необходимо отметить, что тенденция изменения изучаемых показателей у больных контрольной группы на фоне стандартной терапии, хотя и статистически недостоверная, но являлась однонаправленной с динамикой, выявленной у больных тестируемой группы, не смотря на оксидативный стресс, сопутствующий ИБС и АГ [191].

По-видимому, это обусловлено положительным влиянием блокаторов кальциевых каналов и ингибиторов АПФ, входящих в состав стандартной терапии, на концентрацию убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус [19, 192]. Отчасти это может быть связано с тем, что блокаторы кальциевых каналов предотвращают нарушения синтеза простаглицлинов, а также вызванное окислительным стрессом уменьшение уровня глутатиона. Ингибиторы АПФ также снижают оксидативный стресс, запущенный механизмами ишемической болезни сердца и гипертензией. Большинство положительных эффектов ингибиторов АПФ являются результатом снижения концентрации ангиотензина II, увеличения биодоступности брадикинина и активации внутриклеточных брадикинин - зависимых механизмов [193].

Ингибирование АПФ ограничивает стимуляцию сосудистой НАД(Ф)Н-оксидазы, тем самым предотвращает повышенный поток супероксида, связанный с активацией ренин-ангиотензиновой системы. Поскольку супероксид реагирует с NO, ингибирование АПФ улучшает биоактивность NO, что было ранее показано на пациентах с ИБС [194].

Таким образом, дополнительное назначение к стандартной терапии ИБС и АГ лекарственного препарата Кудесан® (содержащего коэнзим CoQ10) приводит к статистически достоверному умеренному повышению концентрации общего CoQ10, значительному увеличению концентрации убихинола и резкому повышению редокс-статуса в плазме крови больных.

5.3. Выводы по главе

1. Установлено, что у больных ИБС, АГ и ФК ХСН 0-I наблюдалось статистически достоверное снижение эндогенной концентрации общего CoQ10 в плазме крови по сравнению с практически здоровыми лицами. Выявленные различия у больных по сравнению с практически здоровыми лицами свидетельствуют об окислительном стрессе, вызванном в организме больных патогенетическими механизмами ИБС, АГ и ХСН.

2. У больных ИБС, АГ и ФК ХСН 0-I из контрольной и тестируемой групп в исходе не выявлено статистически значимых различий в эндогенных плазменных уровнях убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса.

3. По сравнению с исходом у больных из тестируемой группы, получавших дополнительно в составе стандартной терапии лекарственный препарат, содержащий коэнзим Q10, выявлены статистически достоверные различия: умеренно повышалась концентрация общего CoQ10, умеренно снижалась концентрация убихинона, значительно повышалась концентрация убихинола и резко возрастал редокс-статус CoQ10 в плазме крови. При этом концентрация общего CoQ10 в плазме крови больных уже статистически достоверно не отличалась от таковой у практически здоровых лиц.

4. На фоне стандартной терапии у больных из контрольной группы не выявлено статистически значимых различий по сравнению с исходом. Однако наблюдаемая тенденция изменения концентрации общего CoQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса являлась однонаправленной с динамикой изменения этих показателей у больных тестируемой группы на фоне лечения (которая была статически значимой). По-видимому, это обусловлено положительным влиянием блокаторов кальциевых каналов и ингибиторов АПФ, входящих в состав стандартной терапии, на плазменную эндогенную концентрацию общего CoQ10, убихинола и убихинона.

5. У больных тестируемой группы на фоне лечения выявлены статистически

достоверные различия по сравнению с контрольной группой на фоне стандартной терапии: умеренное повышение концентрации общего CoQ10, значительное увеличение концентрации убихинола и резкое повышение редокс-статуса в плазме крови, которые обусловлены дополнительным назначением больным тестируемой группы лекарственного препарата коэнзима Q10 в составе стандартной терапии. 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 с основными причинами развития ИБС, АГ и ХСН на молекулярном уровне.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 35.

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 45. 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.

В связи с относительно низким пределом обнаружения, данная методика может применяться для количественного определения плазменной концентрации только общего CoQ10 у практически здоровых лиц, а для определения убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови больных необходимо разработать более чувствительные методики – с применением метода ВЭЖХ-МС/МС.



Рисунок 35 - Схема пробоподготовки для количественного определения убихинола, убихинона и общего CoQ10 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ и 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 35). Степень извлечения из биологической жидкости составила от 82,3 до 88,5%. 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 35.

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 $5,15 \pm 0,2$ 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 газораспылителя 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 °С, а температура нагревательного блока – 400 °С.

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 36.

Количественное определение убихинона и общего CoQ10 проводили методом внутреннего стандарта с использованием токоферола ацетата. Калибровочная зависимость (Рисунок 37) 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.

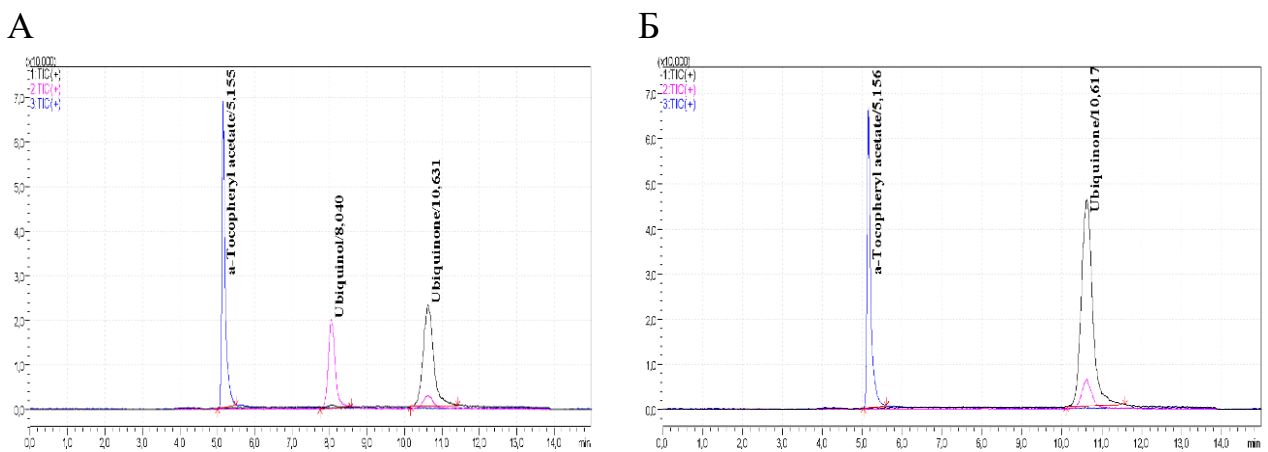


Рисунок 36 - Хроматограмма определения убихинона и убихинола (А) и общего CoQ10 после окисления убихинола (Б) в плазме крови в калибровочной пробе методом ВЭЖХ-МС/МС

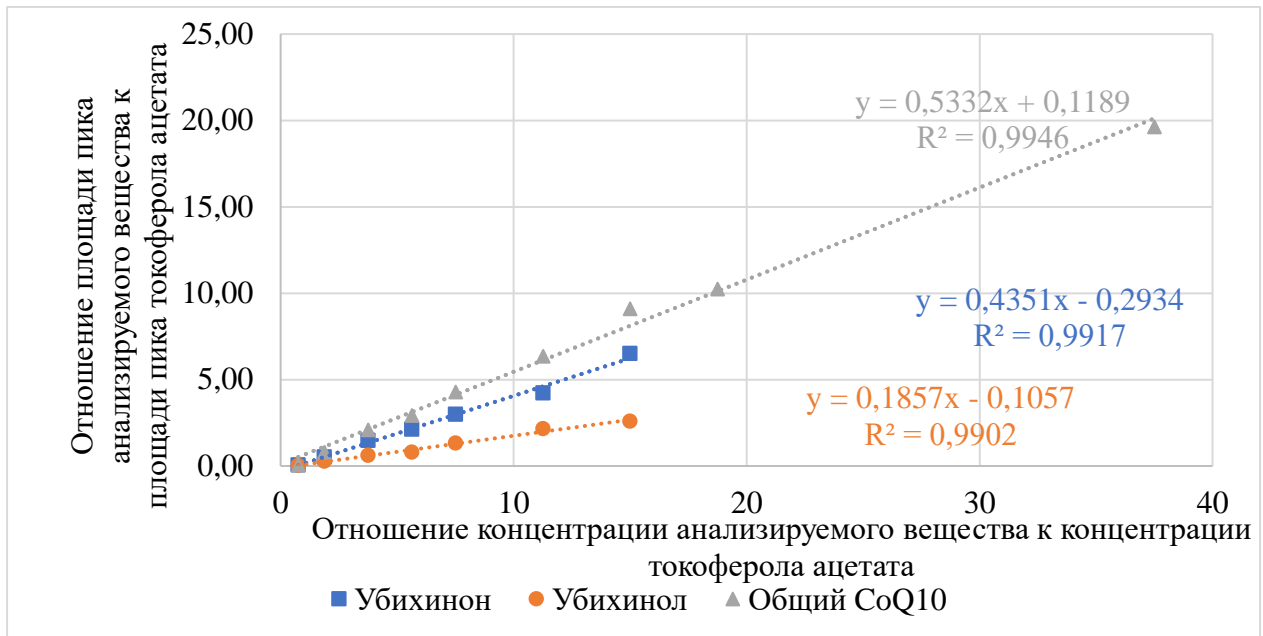


Рисунок 37 - Калибровочные графики зависимости отношения площади хроматографических пиков анализируемых веществ и внутреннего стандарта от отношения концентрации анализируемых веществ и внутреннего стандарта

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 СоQ10 и 17,0% для убихинола при оценке внутрисуточной точности (Таблица 45). 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 [195-198].

Таблица 45 - Метрологические характеристики разработанных методик количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови

μ, мкг/мл	F	\bar{x}	S ²	S (n=6)	Sσ	P%	t табл.	tвыч.	Δx	Δ \bar{x}	ξ, %	ξ̄, %	Sσ,%
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	0,07	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	3,05	1,15
ВЭЖХ-МС/МС													
Убихинон													
0,1	5	0,101	0,0001	0,011	0,004	95	2,57	0,12	0,02	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 CoQ10													
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	0,90	0,28	0,11	26,59	10,86	4,22
5,0	5	4,59	0,221	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	0,005	0,072	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	2,39	0,16	0,07	23,71	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 45

Междневная валидация													
ВЭЖХ-УФ													
Убихинон													
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	0,0059	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	0,002	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	0,060	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	1,461	0,597	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	30,201	12,33	4,80

Примечание – μ – истинное значение измеряемой величины, f – число степеней свободы, S – стандартное отклонение, S^2 – дисперсия, $S\sigma$ – 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; ξ – относительная ошибка среднего результата, $S\sigma, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата

Исследование особенностей распределения убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса у больных первой и второй группы

Усредненные значения концентрации общего CoQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса в плазме крови здоровых лиц и больных представлены в Таблице 46.

Таблица 46 – Усредненные значения концентрации (мкг/мл) общего CoQ10, 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 CoQ10						
Mean	0,569 ¹	0,741 ^{1,2}	0,784 ^{1,2}	0,772 ^{1,2}	0,980 ^{3,4,5}	1,116 ^{2,3,4,6}
S.D.	0,116	0,237	0,224	0,239	0,258	0,423
S.E.	0,014	0,0686	0,064	0,064	0,0691	0,057
C.V., %	20,5	32,1	28,7	31,0	26,4	37,9
Убихинол						
Mean	0,192	0,486 ¹	0,557 ¹	0,521 ¹	0,799 ^{2,3,4}	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 ¹	0,181 ²	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 ¹	3,123 ¹	2,737 ¹	5,814 ^{2,3,4}	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 [10, 14, 82].

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 [14, 52], а полученные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных 1 группы согласуются с литературными данными у больных с ХСН [106, 117].

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 второй 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 [12, 14].

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, динамика изменения их плазменных концентраций

представлена на Рисунке 38.

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 снижает эндогенную плазменную концентрацию убихинола и общего CoQ10, а также приводит 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.

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.

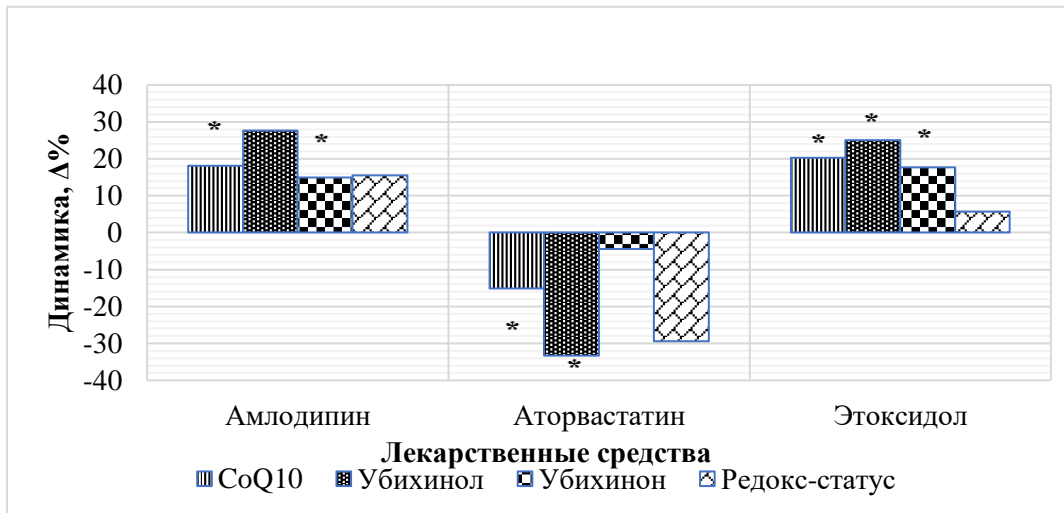


Рисунок 38 – Динамика изменения плазменной концентрации общего CoQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса у больных первой группы при применении различных лекарственных средств по сравнению с контрольной группой (* – статистически достоверные различия)

Для оценки влияния антиоксиданта этоксидола проводили сравнительный анализ полученных концентраций анализируемых веществ у больных подгруппы Г (тестируемая группа) и подгруппы В (контрольная группа). При назначении к 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 46), следует отметить, что они практически совпадали и статистически достоверно не различались (Рисунок 39). Это делает правомочным дальнейшее сравнение результатов, полученных в ходе исследования у этих двух групп больных.

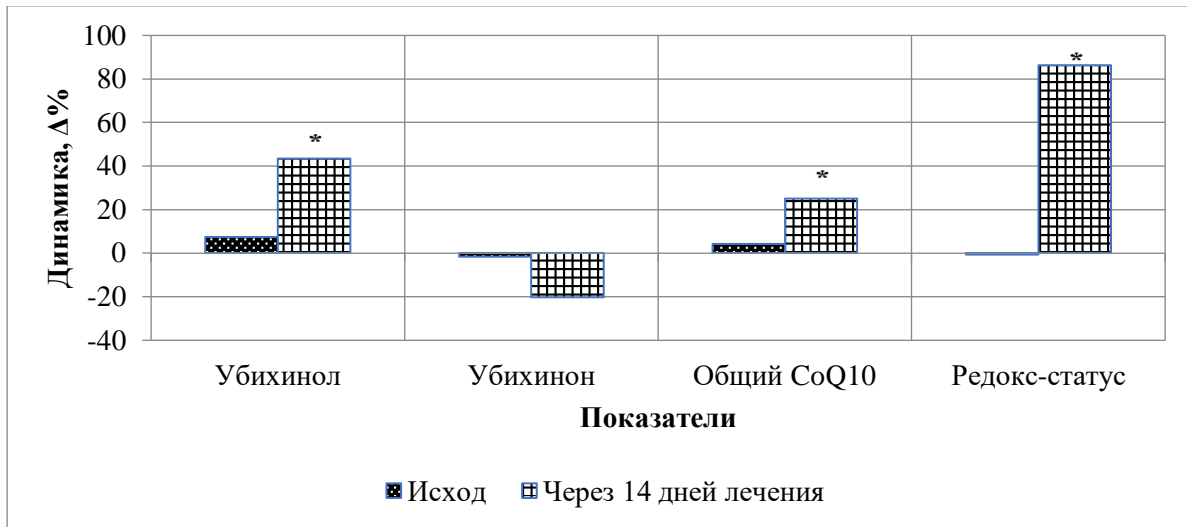


Рисунок 39 – Динамика изменения концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 и редокс-статуса в плазме крови больных тестируемой группы по сравнению с контрольной группой (* – статистически достоверные различия)

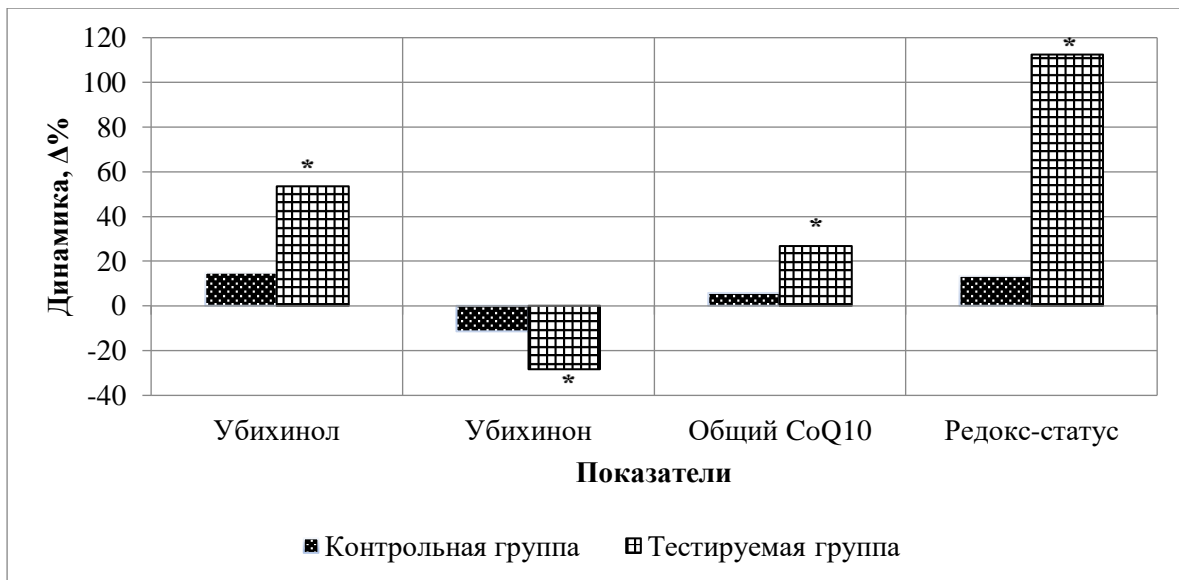


Рисунок 40 – Динамика изменения концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 и редокс-статуса в плазме крови больных на фоне лечения по сравнению с исходом (* – статистически достоверные различия)

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 CoQ10 по сравнению как с исходом (Рисунок 39) , так и по сравнению с больными контрольной группы на фоне стандартной терапии (Рисунок 40). При этом концентрация общего CoQ10 в плазме крови больных уже статистически достоверно не отличалась от таковой у практически здоровых лиц (Таблица 46), а 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 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 детектированием и убихинона, убихинола, общего CoQ10 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 простациклинов 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 этоксидола, 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНА - бутигидроксианизол

ВНТ – бутилгидрокситолуол

CoQ10 - коэнзим Q10

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

m/z – соотношение масса/заряд

RE – степень извлечения

RSD – среднеквадратичное отклонение

UPLC – сверхпроизводительная жидкостная хроматография

АД – артериальное давление

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

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

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ВЭЖХ-ЭХ – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием

ГМГ– коА - 3-метил глутарил - кофермент А

ГМГ– коА-редуктаза - 3-метил глутарил - кофермент А редуктаза

Да – дальтон

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КК – контроль качества

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛС – лекарственное средство

МНО – международное нормализованное отношение

НПКО – нижний предел количественного определения

ПОЛ – пероксидное окисление липидов

СР – саркоплазматический ретикулум

ФК – функциональный класс

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМ – эффект матрицы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arroyo A. NADH and NADPH-dependent reduction of coenzyme Q at the plasma membrane/ A.Arroyo, V.E. Kagan, V.A. Tyurin, et al. // *Antioxid Redox Signal.* - 2000. – Vol. 2. – № 2. – p.251-262.
2. Choksi K.B. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes/ K.B. Choksi, W.H. Boylston, J.P. Rabek et al. // *Biochim Biophys Acta.* - 2004. – Vol. 1688. – № 2. – p.95-101.
3. Singh U. Coenzyme Q10 supplementation and heart failure/ U. Singh, S. Devaraj, I. Jialal// *Nutr Rev.* – 2007. – Vol. 65. – p.286-293.
4. Stocker R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis/ R. Stocker, J.F. Keaney, Jr. *Physiol Rev.* – 2004. – Vol. 84. – № 4. – p.1381-478.
5. Villalba J.M. Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis/ J.M. Villalba, P. Navas// *Antioxid Redox Signal.* -2000. – Vol.2. – № 2. – p.213-30.
6. Ayer A. CoQ10 Function and Role in Heart Failure and Ischemic Heart Disease/ A. Ayer, P. Macdonald, R. Stocker// *Annu Rev Nutr.* – 2015. – №2. – p. 175-213.
7. Wada H. Increased oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as measured by redox status of plasma coenzyme Q10/ H. Wada, S. Hagiwara, E. Saitoh, et al. // *Pathophysiology.* – 2006. – Vol. 13. – № 1. – p.29-33.
8. Кольман Я. Наглядная биохимия/ Я. Кольман, К.Г. Рем. - Москва: М.: Мир, 2000. – 469 С.
9. Belardinelli R. Coenzyme Q10 and exercise training in chronic heart failure / R. Belardinelli, A. Mucaj, F. Lacalaprice, et al. // *Eur Heart J.*- 2006. – Vol.27. – №22. – p.2675-2681.
10. Bhagavan H.N. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics/ H.N. Bhagavan, R.K. Chopra// *Free Radic Res.* – 2006. – Vol.40. – №5. – p. 445-453.
11. Miles M.V. Age-related changes in plasma coenzyme Q10 concentrations and

redox state in apparently healthy children and adults/ M.V. Miles, P.S. Horn, P.H. Tang, et al. // *Clin Chim Acta.* - 2004.-Vol. 347.- №1-2. – p.139-144.

12. Niklowitz P. Coenzyme Q10 serum concentration and redox status in European adults: influence of age, sex, and lipoprotein concentration/ P. Niklowitz, S. Onur, A. Fischer, et al. // *J Clin Biochem Nutr.* – 2016. – Vol.58. – № 3. – p. 240-245.

13. Kalenikova E. I. Hplc estimation of coenzyme Q(10) redox status in plasma after intravenous coenzyme Q(10) administration/ E. I. Kalenikova, E. V. Kharitono., E. A. Gorodetskaya, et al. // *Biomed Khim.* – 2015. – T. 61, № 1. – p. 125-31.

14. Miles M.V. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults/ M.V. Miles, P.S. Horn, J.A. Morrison// *Clin Chim Acta.* 2003. – Vol.332. – №1-2. – p. 123-132.

15. Botelho A. F. M. Coenzyme Q10 Cardioprotective Effects Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Wistar Rat/ A. F. M. Botelho, M. R. Lempek, S. Branco, et al. // *Cardiovasc Toxicol.* – 2020. – Vol. 20. – № 3. – p. 222-234.

16. Khan N. A. Cardioprotective Effect of Coenzyme Q10 on Apoptotic Myocardial Cell Death by Regulation of Bcl-2 Gene Expression/ N. A. Khan, M. Abid , A. Ahmad, et al.// *J Pharmacol Pharmacother.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – p. 122-127.

17. Gutierrez-Mariscal F. M. Coenzyme Q10 and Cardiovascular Diseases/ F. M. Gutierrez-Mariscal, S. de la Cruz-Ares, J. D. Torres-Pena, et al. // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10. – № 6.

18. Jafari M. Coenzyme Q10 in the treatment of heart failure: A systematic review of systematic reviews/ M. Jafari, S. M. Mousavi, A. Asgharzadeh, N. Yazdani // *Indian Heart J.* – 2018. – Vol. 70. – Suppl 1. – p. S111-S117.

19. McMurray J.J. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure/ J.J. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, et al. // *N Engl J Med.* – 2014. – Vol.371.- №11. – p.993-1004.

20. Mosca F. Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step/ F. Mosca, D. Fattorini, S. Bompadre. *Anal Biochem.* – 2002. – Vol. 305.- №1.- p.49-54.

21. Claessens A.J. Rapid and sensitive analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10

in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to studies in healthy human subjects/ A.J. Claessens A, C.K. Yeung, L.J. Risler, et al. // *Ann Clin Biochem.*- 2016.- Vol. 305.- №2.- p.265-273.

22. Ruiz-Jimenez J. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. /Priego-Capote F, Mata-Granados JM, et al.// *J Chromatogr A.* – 2007. – Vol.1175. – №2. – p.242-8.

23. Turi A. Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading/ A. Turi, S.R. Giannubilo, F. Bruge, et al.// *Arch Gynecol Obstet.* – 2012. – Vol. 285. - №4. – p. 1173-1176.

24. Чанчаева Е.А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека/ Е.А. Чанчаева, Р.И. Айзман, А.Д. Герасев // *Экология человека.* – 2007.- №7.-С. 50-58.

25. Подколзин А.А. Антиоксидантная защита организма при старении и некоторых патологических состояниях с ними связанных/ А.А. Подколзин, В.И. Донцов, В.Н. Крутько и др.// *Клиническая геронтология.*- 2001. – №3. – С. 50-58.

26. Сейфулла Р.Д. Лекция. Антиоксиданты/ Р.Д. Сейфулла, Е.А. Рожкова, Е.К. Ким// *Экспериментальная и клиническая фармакология.* -2009. – Т. 72. – №3. –С. 60-64.

27. Kroger A. Quinones and nicotinamide nucleotides associated with electron transfer/ A. Kroger, M. Klingenberg// *Vitam Horm.* - 1970.- №28.- p.533-574.

28. Мартынов А. И. Расширенные возможности применения коэнзима Q10 у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями/ А.И. Мартынов, Г. Н.,Гороховская, В. Л Юн. и др. // *Евразийский кардиологический журнал.* - 2013. - №1.- С. 57-67.

29. Folkers K. Evidence for a deficiency of coenzyme Q10 in human heart disease/ K. Folkers, G.P. Littaru, L. Ho, et al. // *D Int Z Vitaminforsch.* -1970. – Vol 40. – №3. – p.380-90.

30. Deichmann R. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial dysfunction/ R.

- Deichmann, C. Lavie, S. Andrews // *Ochsner J.* – 2010. – Vol. 10. – № 1.- p.16-21.
31. Nohl H. The biochemical, pathophysiological, and medical aspects of ubiquinone function/ H. Nohl, L. Gille, K.Staniek// *Ann N Y Acad Sci.*- 1998.- №854.- p.394-409.
32. Brandt U. Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone--a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex I/ U.Brandt // *Biofactors.*- 1999.- Vol.9.- №2-4.-p.95-101.
33. Siciliano G. Functional diagnostics in mitochondrial diseases/ G. Siciliano, L. Volpi, S. Piazza, et al./ *Biosci Rep*// 2007.- Vol. 27.- №1-3.- p.53-67.
34. Капелько В.И. Активные формы кислорода, антиоксиданты и профилактика заболеваний сердца/ В.И. Капелько// *HV*:. 2003.- .- Т. 11.- №21.-С. 1185-1188.
35. Santos-Ocana C. Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants/ C. Santos-Ocana, T.Q. Do, S. Padilla, et al. // *J Biol Chem.* - 2002.- Vol.277.- №13.-p.10973-10981.
36. Belliere J. Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death/ J. Belliere, C. Cottet-Rousselle, C. Batandier, et al.// *Bioenerg Biomembr.*- 2012.- Vol. 44. - p.207-12.
37. Littarru G.P. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments/ Littarru G.P., Tiano L. // *Mol Biotechnol.*- 2007. – Vol. 37. - №1. – p.31-37.
38. Villalba J.M. Ascorbate and the plasma membrane. A new view of cell growth control/ J.M. Villalba, F. Cordoba, P. Navas// *Subcell Biochem.* – 1996.- Vol.25.- p.57-8.
39. Sharma A. Coenzyme Q10 and Heart Failure: A State-of-the-Art Review/ A. Sharma, G.C. Fonarow, J. Butler // *Circ Heart Fail.* -2016.- Vol.9.- №4.-p. e002639.
40. Turunen M. Induction of endogenous coenzyme Q biosynthesis by administration of peroxisomal inducers/ M. Turunen, P. Sindelar, G. Dallner // *Biofactors.* - 1999.- Vol.9.- №2-4.-p. 131-139.
41. Giboney P.T. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient/ P.T. Giboney// *Am Fam Physician.* -2005.- Vol.71.- №6. - p. 1105-1110.

42. Ibrahim W.H. Dietary coenzyme Q10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria/ W.H. Ibrahim, H.N. Bhagavan, R.K. Chopra, et al.// J Nutr.- 2000.- Vol.130.- №9. - p. 2343-2348.
43. Thomas S.R. A role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis? / S.R. Thomas, P.K. Witting, R. Stocker/ Biofactors. - 1999.- Vol.9.- №2-4.-p. 207-224.
44. Stocker R.Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol/ R.Stocker, V.W. Bowry, B. Frei// Proc Natl Acad Sci USA. -1991.-Vol.88.- №5 .- p.1646-1650.
45. Passi S. Lipophilic antioxidants in human sebum and aging/ S. Passi, O. De Pita P., Puddu, et al.// Free Radic Res. - 2002.- Vol.36.- №4.-p. 471-477.
46. Schneider D. Coenzyme Q10, vitamin E, and dihydrothioctic acid cooperatively prevent diene conjugation in isolated low-density lipoprotein/ D.Schneider, E.F. Elstner// Antioxid Redox Signal. - 2000.- Vol. 2.- № 2.- p.327-333.
47. Аронов Д.М. Что важно знать практическому врачу об убихиноне (коэнзиме Q10)/ Д.М. Аронов //Человек и лекарство.-2006. - С. 223-229.
48. Quinn P.J. Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q/ P.J. Quinn, J.P. Fabisiak, V.E. Kagan// Biofactors. - 1999.- Vol.9.- №2-4.-p. 149-154.
49. Crane F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10/ F.L. Crane // J Am Coll Nutr. - 2001.- Vol.20.- №6.-p. 591-598.
50. Aberg F. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues/ F. Aberg, E.L. Appelkvist, G. Dallner// Arch Biochem Biophys. - 1992.- Vol.295.- №2.- p. 230-234.
51. Белая О.Л. Опыт применения коэнзима Q10 в комплексной терапии ишемической болезни сердца с дислипидемией/ О.Л. Белая//Клиническая медицина. – 2006.- №5. – С.59-62.
52. Niklowitz P. Simultaneous analysis of coenzyme Q10 in plasma, erythrocytes and platelets: comparison of the antioxidant level in blood cells and their environment in healthy children and after oral supplementation in adults/ P. Niklowitz, T. Menke, W. Andler, et al.// Clin Chim Acta. - 2004.- Vol.342.- №1-2.- p. 219-226.

53. Rivara M.B. Effect of Coenzyme Q10 on Biomarkers of Oxidative Stress and Cardiac Function in Hemodialysis Patients: The CoQ10 Biomarker Trial/ M.B. Rivara, C.K. Yeung, C. Robinson-Cohen, et al.// *Am J Kidney Dis.* - 2017.- Vol. 69.- №3.- p.389-399.
54. Kishi H. Bioenergetics in clinical medicine. III. Inhibition of coenzyme Q10-enzymes by clinically used anti-hypertensive drugs./ Kishi T, Folkers K. // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* -1975.- Vol.12.- № 3. – p.533-40.
55. Matsuo K. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood. /Kasai K, Hosoe K, et al.// *Biomed Chromatogr.* – 2016. –Vol.30. –№4. – p.500-502.
56. Grunler J. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins/ J. Grunler, J. Ericsson, G. Dallner// *Biochim Biophys Acta.* - 1994.- Vol.1212.- №3.- p. 259-277.
57. Brown M.S. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis/ M.S. Brown, J.L. Goldstein// *Science.* - 1986. – Vol.232. – №4746. – p. 34-47.
58. Zozina V. I. Coenzyme Q10 in COPD: An Unexplored Opportunity?/ V. I. Zozina, S. Covantev, V. G. Kukes, A. Corlateanu // *COPD.* – 2021. – Vol.. 18. –№ 1. – С. 114-122.
59. Turunen M. Metabolism and function of coenzyme Q/ M. Turunen, J. Olsson, G. Dallner// *Biochim Biophys Acta.* - 2004.- Vol.1660.- №1-2.- p. 171-199.
60. Мартинович Г.Г. Редокс-гомеостаз клеток/ Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич// *Успехи физиологических наук.*- 2008.- Т. 39.- №3.- С.29-44.
61. Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г. , Голубева Е.Н. Редокс-гомеостаз биологических систем: теория и эксперимент/ С.Н. Черенкевич, Г.Г. Мартинович, Е.Н. Голубева// *Журнал ГрГМУ.* 2009.- №2.- С.9-11.
62. Северин С.Е. Биохимия: Учеб. для вузов/ С.Е. Северин. - Москва.- 2003. - 779 с.
63. Schroder C. CCR5 blockade modulates inflammation and alloimmunity in primates/ C. Schroder, R.N. Pierson, 3rd, B.N. Nguyen, et al.// *J Immunol.* - 2007.-

Vol.179.- №4.- p. 2289-2299.

64. Mancini A. Thyroid hormone and oxidative metabolism: Coenzyme Q10 in thyroid's disease/ A. Mancini, L. de Marinis, A. Oradei // Biol Med. - 1993.- Vol.1.- №25.- p. 25-34.

65. Armstrong D. Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols. Methods in Molecular Biology. -2002.- №186.-p.319.

66. Rodriguez-Estrada MT, Determination of coenzyme Q10 in functional and neoplastic human renal tissues. /Poerio A, Mandrioli M, et al. //Anal Biochem. -2006.- Vol.357.- №1.-p.150-2.

67. Abdul-Rasheed O.F., Farid YY, Al-Nasiri US. Coenzyme Q10 and oxidative stress markers in seminal plasma of Iraqi patients with male infertility/ O.F. Abdul-Rasheed, Y.Y. Farid, U.S. Al-Nasiri// Saudi Med J.- 2010.- Vol. 31.- №5.- p.501-506.

68. Alberts AW. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent./ Chen J, Kuron G, et al.// Proc Natl Acad Sci U S A. -1980.- Vol.77.- № 7.- p. 3957-61.

69. Ferreiro-Barros C.C. Determination of a method for extraction of coenzyme Q10 in human plasma: optimization of the use of surfactants and other variables/ C.C. Ferreiro-Barros, E.K. Sugawara, L.R. Sanches// Einstein (Sao Paulo).- 2012.- Vol. 10.- №2.- p. 103-108.

70. Jiang P. Analysis of coenzyme Q(10) in human plasma by column-switching liquid chromatography/ Jiang P., Wu M., Zheng Y., et al. // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.- 2004.- Vol. 805.- №2.- p. 297-301.

71. Jolliet P. Plasma coenzyme Q10 concentrations in breast cancer: prognosis and therapeutic consequences/ P. Jolliet, N. Simon, J. Barre, et al. // Int J Clin Pharmacol Ther. - 1998.-Vol. 36.- №9. – p.506-5099.

72. Battino M. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q9, coenzyme Q9H2, coenzyme Q10, coenzyme Q10H2, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction/ M. Battino, L. Leone, S. Bompadre// Methods Enzymol.- 2004.- Vol. 378.- p.156-62.

73. Leray C. Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of alpha-tocopherol oxidation/ C. Leray, M.D. Andriamampandry, M. Freund, et al. // *J Lipid Res.* - 1998.- Vol. 39.- №10.- p.2099-2105.
74. Lucangioli S. Coenzyme Q10 analytical determination in biological matrices and pharmaceuticals/ S. Lucangioli, M. Martinefski, V. Tripodi// *Front Biosci (Schol Ed).* - 2016.- №8.- C.321-30.
75. Miles L. Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress/ L.Miles, M.V. Miles, P.H. Tang, et al.// *Clin Chim Acta.*- 2005.- Vol. 39.- №1-2.- p.87-96.
76. Петрова В.Е. Определение коэнзима q10 в продукции фармацевтической и косметической промышленности методом вольтамперометрии. Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. - Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ). - Томск, 2015. - 140 с.
77. Kotnik D. Rapid and Sensitive HPLC-MS/MS Method for Quantitative Determination of CoQ10. /M. Krizman et al. // *Research on Precision Instrument and Machinery (RPIM).* -2013.-Vol.2.- №1.-p.6-13.
78. Hansen G. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS/ G. Hansen, P. Christensen, E. Tuchsén, T. Lund// *Analyst.* - 2004.- Vol. 129.- №1.- p.45-50.
79. Prangthip P. An Improvement of Oxidative Stress in Diabetic Rats by Ubiquinone-10 and Ubiquinol-10 and Bioavailability after Short- and Long-Term Coenzyme Q10 Supplementation/ P. Prangthip, A. Kettawan, J. Posuwan, et al.// *J Diet Suppl.*- 2016.- Vol. 13.- №6.- p.647-659.
80. Teshima K. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase/ K.Teshima, T. Kondo // *Anal Biochem.* – 2000.- Vol. 338.- №1.- p.12-19.
81. Бендрышев А.А. Определение витаминов и коэнзимов Q9 и Q10 в объектах со сложной матрицей методом жидкостной хроматографии. . Дис. ... канд. хим.

наук: 02.00.02. - МГУ им. Ломоносова. - Москва, 2012. – 252 с.

82. Tang P.H. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma/ P.H. Tang, M.V. Miles, A. DeGrauw, et al// Clin Chem.- 2001.- Vol. 47.- №2.- p.256-65.

83. Abdallah GM. Effect of lead toxicity on coenzyme Q levels in rat tissues./ El-Sayed el SM, Abo-Salem OM// Food Chem Toxicol. -2010.-Vol.48.- №6.-p.1753-6.

84. Andrade S.C. RPFPG, L.C.P.Roseiro. Determination of the content of coenzymes Q9 and Q10 in pork meat from different breeds Foodbalt. 2014:51-4.

85. Finckh B. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. /Kontush A, Commentz J, et al.//Anal Biochem. -1995.-Vol.232.- №2.-p.210-6.

86. 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.

87. Karpinska J., Mikoluc B, Motkowski R, Piotrowska-Jastrzebska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma/ J.Karpinska, B. Mikoluc, R. Motkowski, J. Piotrowska-Jastrzebska// J Pharm Biomed Anal. -2006.- Vol. 42.- №2.- p.232-236.

88. Franke A.A, Morrison CM, Bakke JL, Custer LJ, Li X, Cooney RV. Coenzyme Q10 in human blood: native levels and determinants of oxidation during processing and storage. Free Radic Biol Med.- 2010.- Vol. 48.- №12.- p.1610-1617.

89. Харитоновна ЕВ. Биофармацевтический анализ и фармакокинетика убидекаренона. Дисс ... канд. фарм. наук: 14.03.06, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет.- Москва, 2014.- 163 с.

90. Abe K. Determination of ubiquinone in serum and liver by high-speed liquid chromatography/ K. Abe, K. Ishibashi, M. Ohmae, et al. // J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). – 1978. – Vol. 24. – № 6. – p. 555-67.

91. Fei X. A rapid and non-invasive fluorescence method for quantifying coenzyme Q10 in blood and urine in clinical analysis/ X. Fei, Y.Yu , Y. Di et al. // J Clin Lab Anal. – 2020. – Vol. 34. – № 4. – P. e23130.
92. Nohara Y. Determination of ubiquinone in blood by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence derivatization using 2-cyanoacetamide/ Y. Nohara, J. Suzuki, H. Kubo // J Fluoresc. – 2011. – Vol.21. – № 6. – С. 2093-100.
93. Kishikawa N. Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinone/ N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, et al. // Anal Bioanal Chem. – 2011. – Vol.400. – № 2. – P. 381-385.
94. Contin M. New analytical strategies applied to the determination of Coenzyme Q10 in biological matrix./ Flor S, Martinefski M, et al.// Methods Mol Biol. -2015.-Vol.1208.-P.409-20.
95. Kommuru T.R. Stability and bioequivalence studies of two marketed formulations of coenzyme Q10 in beagle dogs. /Ashraf M, Khan MA, et al.// Chem Pharm Bull (Tokyo). -1999.-Vol.47.- №7.-P.1024-8.
96. Пивоварова А.М. Митохондриальные нарушения при эпилепсии у детей/ А.М. Пивоварова, В.С. Сухоруков, Е.Д. Белоусова и др.// «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии».-1993.- с. 169.
97. Каленикова Е.И. Редокс-статус и фармакокинетика коэнзима Q10 в плазме крови крысы после его однократного внутривенного введения/ Е.И. Каленикова Е.В. Харитоновна, Е.А. Городецкая и др. // Биомедицинская химия. 2015.-Т. 61.- №1.-С.125-131.
98. Greenberg S. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease/ S. Greenberg, W.H. Frishman// J Clin Pharmacol. - 1990.- Vol.30.- №7.- P.596-608.
99. Marin-Garcia J. Mitochondrial pathology in cardiac failure/ J.Marin-Garcia, M.J. Goldenthal, G.W. Moe // Cardiovasc Res. - 2001.- Vol.49.- №1.- P.17-26.
100. Kumar A. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome/ A. Kumar, H. Kaur, P. Devi , et al. // Pharmacol Ther. - 2009.-

Vol.124.- №3.- P.259-68.

101. Bui A.L. Epidemiology and risk profile of heart failure / A.L. Bui, T.B. Horwich, G.C. Fonarow // *Nat Rev Cardiol.* - 2011.- Vol.8.- №1.- P.30-41.

102. Yamamura Y. Clinical status of coenzyme Q and prospects. *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q/ Y. Yamamura, E. Folkers* // Amsterdam: Elsevier, 1977.- 298 P.

103. Berman M. Coenzyme Q10 in patients with end-stage heart failure awaiting cardiac transplantation: a randomized, placebo-controlled study/ M. Berman, A. Erman, T. Bengal, et al.// *Clin Cardiol.* - 2004.- Vol.27.- №5.- P.295-299.

104. Hofman-Bang C. , Rehnqvist N. , Swedberg K. et al. Coenzyme Q10 as an adjunctive in the treatment of chronic congestive heart failure. The Q10 Study Group/ C. Hofman-Bang, N.Rehnqvist, K. Swedberg et al.// *J Card Fail.* 1995.- Vol.1.- №2.- P.101-107.

105. Judy W.V. Myocardial preservation by therapy with coenzyme Q10 during heart surgery/ W.V. Judy, W.W. Stogsdill, K. Folkers // *Clin Investig.* – 1993.- №71(8 Suppl). –P.155-161.

106. Keogh A. , Fenton S. , Leslie C. et al. Randomised double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q, therapy in class II and III systolic heart failure/ A. Keogh, S. Fenton, C. Leslie, et al.// *Heart Lung Circ.*- 2003.- Vol.12.- №3. - P.135-141.

107. Khatta M. The effect of coenzyme Q10 in patients with congestive heart failure/ M. Khatta, B.S. Alexander, C.M. Krichten, et al.// *Ann Intern Med.* - 2000.- Vol.132.- №8. - P.636-640.

108. Kim WS. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma. /Kim MM, Choi HJ, et al.// *Invest New Drugs.* -2001.-Vol.19.- №1.- P.81-3.

109. Langsjoen P.H. Effective treatment with coenzyme Q10 of patients with chronic myocardial disease/ P.H. Langsjoen, S. Vadhanavikit, K.Folkers// *Drugs Exp Clin Res.* - 1985.- Vol.11.- №8. - P.577-579.

110. Langsjoen P.H. Response of patients in classes III and IV of cardiomyopathy to

therapy in a blind and crossover trial with coenzyme Q10// P.H. Langsjoen, S. Vadhanavikit, K.Folkers// Proc Natl Acad Sci U S A. - 1985.- Vol.82.- №12. - P.4240-4244.

111. Morisco C. Noninvasive evaluation of cardiac hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure: effects of short-term coenzyme Q10 treatment/ C. Morisco, A. Nappi, L. Argenziano, et al. // Mol Aspects Med. – 1994.- №15 Suppl. –P. 155-163.

112. Morisco C. Effect of coenzyme Q10 therapy in patients with congestive heart failure: a long-term multicenter randomized study/ C. Morisco, B. Trimarco, M. Condorelli// Clin Investig. - 1993.- №71(8 Suppl) . - P.134-136.

113. Mortensen S.A. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial/ S.A. Mortensen, F. Rosenfeldt, A. Kumar, et al.// JACC Heart Fail. - 2014.- Vol.2.- №6. - P.641-9.

114. Munkholm H. Coenzyme Q10 treatment in serious heart failure/ H. Munkholm, H.H. Hansen, K. Rasmussen Biofactors. - 1999.- Vol.9.- №2-4. - P.285-289.

115. Permanetter B. Ubiquinone (coenzyme Q10) in the long-term treatment of idiopathic dilated cardiomyopathy/ B. Permanetter, W.Rossy , G. Klein, et al.// Eur Heart J. - 1992.- Vol.13.- №11. - P.1528-1533.

116. Poggesi L. Effect of coenzymeQ10 on left ventricular function in patients with dilative cardiomyopathy: a medium-term randomized double-blind study versus placebo/ L. Poggesi, M. Comeglio, L. Toncelli, et al.// Curr Ther Res. - 1991.- №49. - P.878–886.

117. Folkers K. Biochemical rationale and the cardiac response of patients with muscle disease to therapy with coenzyme Q10/ K. Folkers, J. Wolaniuk, R. Simonsen, et al.// Proc Natl Acad Sci U S A. - 1985.- Vol.82.- №13. - P.4513-4516.

118. Haas R.H. The evidence basis for coenzyme Q therapy in oxidative phosphorylation disease/ R.H. Haas// Mitochondrion. – 2007.- №7 Suppl.- P.136-145.

119. Килейников Д.В. Иванов А.Г. Анализ распространенности патологии щитовидной железы в Тверском районе/ Д.В. Килейников, А.Г. Иванов// Верхневолжский медицинский журнал. -2012.- Т. 2.- №2.- С. 38-46.

120. Belardinelli R. Coenzyme Q10 improves contractility of dysfunctional myocardium in chronic heart failure/ R. Belardinelli, A. Mucaj, F. Lacalaprice, et al. // *Biofactors*. - 2005.- Vol.25.- №1-4.- P.137-45.
121. Rosenfeldt F. Coenzyme Q10 therapy before cardiac surgery improves mitochondrial function and in vitro contractility of myocardial tissue/ F. Rosenfeldt, S. Marasco W., Lyon, et al.// *J Thorac Cardiovasc Surg*. -2005.- Vol.129.- №1. - P.25-32.
122. Горошко О.А. Значение редокс-статуса коэнзима Q10 как биомаркера окислительного стресса/ О.А. Горошко, Л.М. Красных, В.Г. Кукес, В.И. Зозина// *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 146-152.
123. Hool L.C. Role of NAD(P)H oxidase in the regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channel function during acute hypoxia/ L.C. Hool, C.A. Di Maria, H.M. Viola, et al. // *Cardiovasc Res*. - 2005.- Vol.67.- №4. - P.624-635.
124. Ebadi M. Actions and functions of mitochondria and their ubiquinone (coenzyme Q10)/ M. Ebadi //Scottsdale, Arizona, 2001.
125. Nayler W.G. The use of coenzyme Q10 to protect ischaemic heart muscle/ W.G. Nayler// *Biomedical functions of coenzyme Q*. - 1980. – Vol.2.-P.409-425.
126. Papucci L. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property/ L. Papucci, N. Schiavone, E. Witort, et al.// *J Biol Chem*. - 2003. –Vol. 278.- №30. - P.28220-28228.
127. Walter L. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site/ L. Walter, V. Nogueira, X. Leverage, et al. // *J Biol Chem*. - 2000. –Vol. 275.- №38. - P.29521-29527.
128. Левченкова О.С. митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия/ О.С. Левченкова В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова// *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2014. – Т. 13. - №4. – С.24-33.
129. Di Lisa F. , Canton M. , Menabo R. , et al. Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition/ F. Di Lisa, M.Canton, R. Menabo, et al. // *Basic Res Cardiol*. - 2003. –Vol. 98.- №4. - P.235-241.

130. Crestanello J.A. Elucidation of a tripartite mechanism underlying the improvement in cardiac tolerance to ischemia by coenzyme Q10 pretreatment/ J.A. Crestanello, J. Kamelgard, D.M. Lingle, et al. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 1996. –Vol. 111.- №2. - P.443-450.
131. Burke B.E. Neuenschwander R, Olson RD. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in isolated systolic hypertension/ B.E. Burke // *South Med J.* - 2001. –Vol. 94.- №11. – P. 1112-1117.
132. Zhou M. Effects of coenzyme Q10 on myocardial protection during cardiac valve replacement and scavenging free radical activity in vitro/ M. Zhou, Q.Zhi , Y. Tang, et al.// *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1999. –Vol. 40.- №3. - P.35-61.
133. Digiesi V. Coenzyme Q10 in essential hypertension/ V. Digiesi, F. Cantini, A. Oradei, et al. // *Mol Aspects Med.* – 1994. -№ 15 Suppl. – P.257-263.
134. Grunfeld S. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats/ S. Grunfeld, C.A.Hamilton, S. Mesaros, et al. // *Hypertension.* - 1995. –Vol. 26.- №6. – P. 854-857.
135. Folkers K. Bioenergetics in clinical medicine. XVI. Reduction of hypertension in patients by therapy with coenzyme Q10 / K. Folkers, J. Drzewoski, P.C. Richardson // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1981. –Vol. 31.- №1. – p.129-140.
136. Watts G.F. Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus/ G.F. Watts, D.A. Playford, K.D. Croft et al.// *Diabetologia.* 2002. –Vol. 45.- №3. – p.420-426.
137. Mantle D. Coenzyme Q10 supplementation for diabetes and its complications: an overview/ D. Mantle. // *The British Journal of Diabetes.*- 2017. –Vol. 17.- №41. – P.145-148.
138. Pepe S. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease/ S. Pepe, S.F. Marasco, S.J. Haas, et al. // *Mitochondrion.* - 2007.- №7 Suppl. - 154-167.
139. Ates O. Plasma coenzyme Q10 levels in type 2 diabetic patients with retinopathy/ O. Ates, H. Bilen, S. Keles, et al. // *Int J Ophthalmol.* -2013. –Vol. 6.- №5. – P.675-679.
140. Montano S.J., Grunler J., Nair D., et al. Glutaredoxin mediated redox effects of

coenzyme Q10 treatment in type 1 and type 2 diabetes patients/ S.J. Montano, J. Grunler, D. Nair, et al. // *BBA Clin.* - 2015.- №4. – P.14-20.

141. Eriksson J.G. Effect of CoQ10 administration on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus/ J.G. Eriksson, S.A. Mortensen, M. Rohde // *Biofactors.* - 1999.– №9. – P.315–318.

142. Ochoa J.J. , Quiles J.L. , Huertas J.R. , et al. Coenzyme Q10 protects from aging-related oxidative stress and improves mitochondrial function in heart of rats fed a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet/ J.J. Ochoa, J.L. Quiles, J.R. Huertas, et al. // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* - 2005. –Vol. 60.- №8. – P.970-975.

143. El-ghoroury E.A. Malondialdehyde and coenzyme Q10 in platelets and serum in type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control/ E.A. El-ghoroury, H.M. Raslan, E.A. Badawy, et al. // *Blood Coagul Fibrinolysis.* - 2009.–Vol. 20.- №4. – P.248-51.

144. Folkers K. Activities of vitamin Q10 in animal models and a serious deficiency in patients with cancer/ K. Folkers, A. Osterborg, M. Nylander, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* 1997.–Vol. 234.- №2. – P.296-299.

145. Chai W. Plasma coenzyme Q10 levels and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study / W. Chai, R.V. Cooney, A.A. Franke, et al.// *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* - 2010.–Vol. 19.- №9. – P.2351-2356.

146. Ben-Meir A. Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging/ A. Ben-Meir, E. Burstein, A. Borrego-Alvarez, et al. // *Aging Cell.* - 2015.–Vol. 14.- №5. – P.887-895.

147. Turi A. Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading/ A. Turi, S.R. Giannubilo, F. Bruge, et al.// *Arch Gynecol Obstet.* – 2012. – Vol. 285. - №4. – P. 1173-1176.

148. Hiebert JB SQ. Application of coenzyme Q10 in clinical practice./ Pierce JD. // *Int J Intern Med.* -2012.- Vol. 9. -№2- P. 1-10.

149. Dhanasekaran M. The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. /Ren J. // *Curr*

Neurovasc Res. -2005.- Vol. 2. - №5.- P.447-59.

150. Beal MF. Coenzyme Q10 as a possible treatment for neurodegenerative diseases. . Free Radic Res. 2002;36(4):455-60.

151. Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. Methods Enzymol. 2004(382):473-87.

152. Molyneux S.L. Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement?/ S.L. Molyneux, J.M. Young, C.M. Florkowski, et al.// Clin Biochem Rev. – 2008.- Vol.29.- №2. - P.71-82.

153. Mancini A. Effects of testosterone on antioxidant systems in male secondary hypogonadism/ A.Mancini, E. Leone, R. Festa, et al.// J Androl. - 2008.- Vol.29.- №6.- P. 622-629.

154. Mancini A. Thyroid hormones and antioxidant systems: focus on oxidative stress in cardiovascular and pulmonary diseases/ A. Mancini, S. Raimondo, C. Di Segni, et al.// Int J Mol Sci. - 2013.- Vol.14.- №12.- P. 23893-23909.

155. Stancu C. Statins: mechanism of action and effects./ Sima A.// J Cell Mol Med. - 2001.- Vol.5.- №4.- P. 378-87.

156. Berthold HK. Effect of ezetimibe and/or simvastatin on coenzyme Q10 levels in plasma: a randomised trial. /Naini A, Di Mauro S, et al. //Drug Saf. -2006.- Vol.29.- №8.- P.703-12.

157. Diebold BA. Influences of lovastatin administration on the respiratory burst of leukocytes and the phosphorylation potential of mitochondria in guinea pigs. /Bhagavan NV, Guillory RJ.//Biochim Biophys Acta. -1994.- Vol.1200. -№2.-P.100-8.

158. Nakahara K. Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: a pathological, electrophysiological, and biochemical study. /Kuriyama M, Sonoda Y, et al.// Toxicol Appl Pharmacol. -1998.-Vol.152.- №1.- P. 99-106.

159. Satoh K. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors increase myocardial stunning in dogs. /Ichihara K.// J Cardiovasc Pharmacol. -2000.-Vol.35.- №2.- P.256-262.

160. Delbosc S. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. /Cristol JP, Descomps B, et al.// Hypertension. -2002.- Vol.40.- №2.-

P.142-7.

161. Golomb BA. Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. /Evans MA.// Am J Cardiovasc Drugs. -2008.- Vol.8.- №6.- P.373-418.

162. Silva MA. Statin-related adverse events: a meta-analysis. /Swanson AC, Gandhi PJ, et al. //Clin Ther. -2006.- Vol.28. №1.- P.26-35.

163. Buchholz U. Haff disease: from the Baltic Sea to the U.S. shore. /Mouzin E, Dickey R, et al.// Emerg Infect Dis. -2000.- Vol.6.- №2. P. 192-5.

164. Franc S. A comprehensive description of muscle symptoms associated with lipid-lowering drugs. /Dejager S, Bruckert E, et al.// Cardiovasc Drugs Ther. -2003.-Vol.17.- №5-6.-P.459-65.

165. Zita C. Serum coenzyme Q10 concentrations in healthy men supplemented with 30 mg or 100 mg coenzyme Q10 for two months in a randomised controlled study/ C. Zita, K. Overvad, S.A. Mortensen, et al. // Biofactors.- 2003.- Vol. 289.- №1-4.- P.185-193.

166. Нехороший А.А. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная система в реализации восстановительной функции сна/ А.А. Нехороший, Т.А. Шустанова, А.А. Буриков и др.// Физиология человека.- 2009.- Т. 35.- №4.-С. 71-75.

167. Laaksonen R. Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans./ Jokelainen K, Sahi T, et al.//Clin Pharmacol Ther. -1995.-Vol.57.- №1.- P.62-6.

168. Rundek T. Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke. /Naini A, Sacco R, et al.//Arch Neurol. - 2004.- Vol.61.- №-6.-P.889-92.

169. Thibault A. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer/ A.Thibault, D. Samid, A.C. Tompkins, et al. // Clin Cancer Res. 1996. - Vol.2.- №3.-P. 483-491.

170. Caso G. Effect of coenzyme q10 on myopathic symptoms in patients treated with statins/ G. Caso, P. Kelly, M.A. McNurlan, et al. // Am J Cardiol. - 2007.–Vol. 99.- №10. – P.1409-1412.

171. Bosch X. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. /Poch E, Grau JM.// N Engl J Med. -2009.-Vol.361.- №1.-P.62-72.
172. Huerta-Alardin AL. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians. / Varon J, Marik PE.// Crit Care. -2005.-Vol.9.- №2.-P.158-69.
173. Vanholder R. Rhabdomyolysis. /Sever MS, Ereik E, et al.// Am Soc Nephrol. - 2000.- Vol.11.- №8.-P.1553-1561.
174. Marcoff L. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. /Thompson PD.// J Am Coll Cardiol. -2007.-Vol.49.- №23.- P.2231-2237.
175. Каленикова Е.И. Фармакокинетика коэнзима Q10/ Е.И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О.С. Медведев // Русский Медицинский Журнал. – 2008. – № 5. – С. 338.
176. Мареев В.Ю. Кудесан® (капли 3% для приема внутрь) в лечении больных сердечной недостаточностью: Эффективность и безопасность в комбинации со стандартной терапией (кудесник). Дизайн и результаты проспективного рандомизированного двойного слепого исследования кудесник/ В.Ю. Мареев, Ю. В. Минина, Ю.Л. Беграмбекова // Сердечная недостаточность. – 2016. – Т. 17. – С. 236- 249.
177. Гочарова М.В. Клиническая эффективность коэнзима Q10 (Кудесан) в терапии ишемической болезни сердца у пациентов со стабильной стенокардией напряжения II–III функционального класса./М.В. Гончарова// Архивъ внутренней медицины. – 2012. – № 4. – С. 15-19.
178. Zozina V. Analytical Method Development for Coq10 Determination in Human Plasma Using HPLC-UV and HPLC/MS/MS/V. Zozina, Melnikov E.S., O.A. Goroshko et al.// Current Pharmaceutical Analysis –2019. – Vol. 15. – №7 <https://doi.org/10.2174/1573412915666190328215854>.
179. Hassett DJ. Bactericidal antibiotics and oxidative stress: a radical proposal. /Imlay JA.// ACS Chem Biol. -2007.- Vol.2.- № 11.- P.708-10.
180. 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.
181. 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.
182. Mitsui J. Plasma Coenzyme Q10 Levels in Patients With Multiple System Atrophy. /Matsukawa T, Yasuda T, et al.// JAMA Neurol. -2016.- Vol.73.- №8. – P.977-80.
183. Красных Л.М. Количественное определение убихинона и убихинола в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором/ Л.М. Красных, В.И. Зозина, Е.С. Мельников и др.// Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56. – № 7. – С. 55-59.
184. Кукес В.Г.Механизм действия Этоксидола на показатели окислительного стресса при сердечной недостаточности и гипертонии/В.Г. Кукес, О. К. Парфенова, Б.К. Романов, А.Б. Прокофьев, Е.В. Парфенова, Н.Г. Сидоров, А.А. Газданова, Л.И. Павлова, В.И. Зозина [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 67-72.
185. Kibel A. Oxidative Stress in Ischemic Heart Disease/ A. Kibel, A. M. Lukinac, V. Dambic, et al. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – Vol. 2020. – P. 6627144.
186. Kalenikova E.I. Bioavailability of coenzyme Q(10) in various pharmaceutical formulations/ E.I.Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, O.S.Medvedev// Pharmaceutical Chemistry Journal. – Vol. 43. – №8. –P. 468-471.
187. Kalenikova E.I. Pharmacokinetics of Coenzyme Q(10)/ E.I.Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, O.S.Medvedev// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – Vol. 146. - №3. - P. 313-316.
188. Yokoyama H. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect/ H. Yokoyama, D. M. Lingle, J. A. Crestanello, et al.// Surgery. – 1996. – Т. 120, № 2. – С. 189-96.
189. Belardinelli R. Oxidative stress, endothelial function and coenzyme Q10/ R. Belardinelli, L.Tiano, G.P. Littarru Biofactors. - 2008.- Vol.32.- №1-4. - P.129-133.

190. Zozina V. I. Coenzyme Q10 in Cardiovascular and Metabolic Diseases: Current State of the Problem/ V. I. Zozina, S. Covantev , O. A. Goroshko, et al.// *Curr Cardiol Rev.* – 2018. – Vol. 14. – № 3. – С. 164-174.
191. Hasanloei M. A. V. Effect of coenzyme Q10 supplementation on oxidative stress and clinical outcomes in patients with low levels of coenzyme Q10 admitted to the intensive care unit/ M. A. V. Hasanloei, A. Zeinaly, M. Rahimlou, et al. // *J Nutr Sci.* – 2021. – Vol. 10. – P. e48.
192. Shikh E. 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 Metab Pers Ther.* – 2020. – Vol. 35. – № 2. – P. 20200106
193. Mikrut K. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress intensity in hyperglycemic conditions in rats independently from bradykinin receptor inhibitors/ K. Mikrut, J. Kupsz, J. Kozlik , et al. // *Croat Med J.* – 2016. – T. 57. – № 4. – P. 371-380.
194. Laursen J. B. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension/ J. B. Laursen, S. Rajagopalan, Z. Galis , et al. // *Circulation.* – 1997. – T. 95. – № 3. – p. 588-593.
195. Guideline on bioanalytical method validation/ Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-e-bioanalytical-method-validation_en.pdf
196. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. - Washington, DC, - 2013. – 44 P.
197. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: методические указания/ Бондарева И.Б. и др. Москва: Федеральное государственное учреждение «Научный Центр Экспертизы Средств Медицинского Применения», 2008. 32с.
198. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности

лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №85 [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/>