

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES

УДК 577.121.7

© Л.Г. Мишура, В.А. Дадали, Ю.В. Дадали, 2013

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА CoQ_{10} «КУДЕСАН» НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ

EFFECT OF CoQ_{10} «KUDESAN» ON THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN OF LEUKOCYTES

Л.Г. Мишура, В.А. Дадали, Ю.В. Дадали

L.G. Mishura, V.A. Dadali, Yu.V. Dadali

*Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg*

Контакт: Л.Г. Мишура, e-mail: doctormlg@mail.ru

Изучено влияние CoQ_{10} (препарат «Кудесан») на активность I–IV комплексов дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов доноров *in vitro* (в концентрациях 0,625, 0,063, 0,024, 0,012, 0,0024 мкмоль/мл) и концентрационная зависимость этого влияния. Установлено, что наиболее выраженным влиянием на энергетический метаболизм клеток обладает CoQ_{10} в концентрациях 0,0121 и 0,024 мкмоль/мл. При этом возрастает не только активность I и IV комплексов, но и эффективность работы всей дыхательной цепи. Полученные результаты позволяют судить об увеличении доли аэробных окислительно-восстановительных процессов в энергетическом метаболизме клеток под воздействием препарата «Кудесан».

Ключевые слова: дыхательная цепь, CoQ_{10} , кудесан, лейкоциты

The aim of the present work was to study the effect of the drug CoQ_{10} «Kudesan» in different concentrations on the respiratory chain and the related effects. The experiment was performed with the use of donor leukocytes, which were incubated with a solution of CoQ_{10} in various concentrations. It is established that the best influence on the energy metabolism of cells has CoQ_{10} (drug «Kudesan») at concentrations close to 0,0121 and 0,024 mmol/ml, with not only increased the activity of complexes I and IV, but also the efficiency of the respiratory chain. Also on the results obtained allow us to judge the increasing share of aerobic oxidation-reduction processes in the energy metabolism of the cells under the influence of the drug CoQ_{10} «Kudesan».

Key words: respiratory chain, CoQ_{10} , Kudesan, leukocytes.

Введение

Убихинон (коэнзим Q_{10} , CoQ_{10}) является низкомолекулярным фактором дыхательной цепи митохондрий клеток. Адекватное количество коэнзима Q_{10} , наряду с ферментативными компонентами дыхательной цепи, необходимо для энергетического обеспечения клеток [1]. Дыхательная цепь митохондрий представляет собой сложную мультикомпонентную систему, состоящую из пяти комплексов, локализованных во внутренней мембране митохондрий: НАДН- CoQ -оксидоредуктаза (ком-

плекс I), сукцинат-оксидоредуктаза (комплекс II), CoQ -цитохром-оксидоредуктаза (комплекс III) цитохром С оксидаза (комплекс IV) и АТФ-синтазы. Непосредственный синтез АТФ осуществляет АТФ-синтаза, локализованная во внутренней мембране митохондрий в непосредственной близости к электрон-транспортной цепи [1]. Кроме того, в восстановленной форме убихинон (убихинол) является внутриклеточным и сывороточным антиоксидантом. При ряде патологических состояний и с возрастом нарушается способность организма синтезировать

достаточное количество убихинона [2, 3]. Это может быть связано со снижением его биосинтеза из-за неадекватности питания, генетическими или приобретёнными дефектами митохондрий (например, при митохондриальных заболеваниях), а также с повышением потребности тканей в нём (особенно при физических нагрузках). Биосинтез убихинона, первые стадии синтеза которого являются общими с биосинтезом холестерина, тормозится статинами и β -адреноблокаторами [4, 5]. Клетки и ткани с высокой метаболической активностью имеют более высокие потребности в убихиноне (сердце, мышечная ткань, нервная и иммунная системы), и они же являются более чувствительными к его дефициту. Тканевой дефицит или недостаточный сывороточный уровень CoQ_{10} описан для широкого круга заболеваний, включая сердечно-сосудистые (в том числе риск сердечной смерти) и нейродегенеративные (синдром Альцгеймера, болезнь Паркинсона), гипертензию, диабет и др. [5–9]. Уровень Q_{10} снижается с возрастом, и это проявляется в виде возрастных изменений метаболизма [2]. Пероральный приём CoQ_{10} повышает его содержание в крови и тканях (в том числе в митохондриях) [7], и это позволяет скорректировать дефицит кофермента Q_{10} [5,9].

Использование различных форм кофермента Q_{10} , как и цитохрома С и сукцината как компонентов дыхательной цепи, в сочетании с другими антигипоксантами и веществами переносчиками, такими как L-карнитин и другими энерготропными препаратами, получило общее название – «энерготропная терапия» [10, 11]. Однако так же, как и для других метаболических средств, рациональные основы для их клинического применения разработаны недостаточно, при том что область патогенетически обоснованного использования энерготропных препаратов, в том числе препаратов кофермента Q_{10} , очень широкая [10, 11].

Лечебно-профилактическое применение соответствующих препаратов кофермента Q_{10} диктует необходимость исследования его влияния на митохондриальную систему организма уже на уровне клинико-диагностических лабораторий (КДЛ). В условиях же КДЛ это возможно только на основе анализа энергетического метаболизма форменных элементов крови – лейкоцитов и тромбоцитов. Однако подобные биохимические исследования в литературе отсутствуют. Целью настоящей работы являлось изучение влияния коэнзима Q_{10} (на примере водорастворимого препарата кофермента Q_{10} «Кудесан» фирмы «Аквион») в различных концентрациях на дыхательную цепь митохондрий лейкоцитов в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен с использованием клеток крови (лейкоцитов и эритроцитов) доноров. Кровь отбирали в стандартные гематологические пробирки (с ЭДТА). Лейкоциты выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности [12]. Полученные лейкоциты ресуспендировали в изотоническом (0,154 М NaCl) фосфатном буфере (рН 7,0) и гомогенизировали (гомогенизатор САТ

Х-120 (Германия)). Все операции выполняли при температуре 2°C в присутствии аprotинина. Для определения проницаемости биомембран по отношению к CoQ_{10} в качестве модели использовали эритроциты, которые инкубировали с препаратами CoQ_{10} в тех же условиях. Кофермент Q_{10} в составе препарата «Кудесан» был исследован в концентрациях 0,625, 0,063, 0,024, 0,012, 0,0024 мкмоль/мл. Инкубацию клеток с CoQ_{10} проводили в течение одного часа при стандартных условиях в фосфатном буфере (0,154 М NaCl, рН 7,4), после чего клетки трижды отмывали фосфатным буфером и гомогенизировали с использованием гомогенизатора САТ Х120 (Германия). В качестве контроля использовали те же лейкоциты, находившиеся в тех же условиях, но без воздействия препарата. Концентрацию убихинона определяли спектрофотометрически [13]. Проницаемость биомембран для убихинона оценивали на модели эритроцитарных мембран [13]. Влияние кофермента Q_{10} на активность комплексов дыхательной цепи (I–IV), активность ферментов (ЛДГ, АЛТ, АСТ, ГГТП, липазы, каталазы, СОД) в опытах с лейкоцитами определяли спектрофотометрически [13]. Активность комплексов цепи передачи электронов митохондрий лейкоцитов (НАДН- CoQ -оксидоредуктазы (комплекс I), НАДН-цитохром С-оксидоредуктазы (функциональный комплекс I–III); сукцинат-цитохром С-оксидоредуктазы (функциональный комплекс II–III); цитохром с оксидазы (комплекс IV)) определяли с использованием специфических субстратов, ингибиторов, доноров и акцепторов электронов ранее описанным способом [14] в кинетическом режиме на биохимическом анализаторе KONE Specific Basic (Финляндия). Сопряжённость функции комплексов дыхательной цепи оценивали по отношению к активности цитохром-С-оксидазы, последнего фермента дыхательной цепи. Другие указанные выше показатели определяли стандартными методами, принятыми в клинической лабораторной практике с использованием биохимического анализатора COBAS Integra 400 plus (Швейцария). Концентрацию магния определяли с помощью ион-селективного электрода (Mettler Toledo). Все полученные результаты нормализовали по содержанию белка, концентрацию которого определяли по Lowry [15]. При статистической обработке рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, достоверность отличий контроля и экспериментальных значений рассчитывали с применением t-критерия Стьюдента для связанных выборок. Критической величиной уровня значимости считали $p < 0,05$. Для расчётов использовали программный пакет PASW Statistics 18.

Результаты и обсуждение

Исследование препарата «Кудесан» показало, что CoQ_{10} практически при всех изученных концентрациях приводил к увеличению активности I комплекса дыхательной цепи лейкоцитов, и лишь при концентрации CoQ_{10} 0,625 мкмоль/мл было отмечено весьма значительное снижение (на 73%) активности этого комплекса (табл. 1). Наибольший рост активности I комплекса был отмечен при концентрации убихинона 0,0024 мкмоль/мл (26%, $p < 0,01$).

Таблица 1

Изменение активности дыхательных комплексов лейкоцитов при воздействии CoQ («Кудесан») в различных концентрациях

Показатель, единицы измерения	Концентрация коэнзима Q ₁₀ в мкмоль/мл				
	0,625	0,063	0,024	0,0121	0,0024
	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)
I комплекс, МЕ/г белка	1,56±0,08*	7,1±0,3*	12,56±0,75*	12,21±0,6*	12,8±0,5*
I комплекс контроль, МЕ/г белка	5,8±0,3	5,8±0,3	10,2±0,6	10,2±0,6	10,2±0,6
I–III комплекс, МЕ/г белка	2,71±0,16*	3,88±0,16*	3,15±0,16*	3,23±0,16**	3,54±0,14
I–III комплекс контроль, МЕ/г белка	4,71±0,24	4,71±0,24	3,55±0,2	3,55±0,2	3,55±0,2
II–III комплекс, МЕ/г белка	4,22±0,2*	5,46±0,2*	7,91±0,5*	8,49±0,4**	8,12±0,3*
II–III комплекс контроль, МЕ/г белка	4,8±0,2	4,8±0,2	9,26±0,6	9,26±0,6	9,26±0,6
IV комплекс, МЕ/г белка	0,89±0,05*	1,55±0,07**	2,72±0,14*	3,02±0,15*	2,07±0,1**
IV комплекс контроль, МЕ/г белка	1,68±0,1	1,68±0,1	2,21±0,13	2,21±0,13	2,21±0,13

* – p<0,01; ** – p<0,05.

Активность функционального комплекса НАДН-цитохром С-оксидоредуктазы (функциональный комплекс I–III) была снижена практически при всех изученных концентрациях (за исключением 0,0024 мкмоль/мл CoQ₁₀, когда активность указанного комплекса не изменялась). Наибольшее снижение активности отмечено при концентрации 0,625 мкмоль/мл – на 43% (p<0,01). При концентрациях 0,0121 мкмоль/мл и 0,024 мкмоль/мл снижение активности функционального комплекса I–III составило 10%.

Активность функционального комплекса сукцинат-цитохром С-оксидоредуктазы (функциональный комплекс II–III) также снижалась. При концентрациях убихинона 0,0024, 0,0121, 0,024, 0,625 мкмоль/мл снижение активности составило соответственно 12%, 8%, 15% и 12%. И лишь при концентрации CoQ₁₀ 0,063 мкмоль/мл рост активности функционального комплекса II–III составил 14%.

Активность цитохром С оксидазы (комплекс IV) была снижена при концентрациях убихинона 0,625 мкмоль/мл на 47%, а при концентрациях 0,0024, 0,063 мкмоль/мл менялась незначительно (7–8%). При концентрациях 0,0121 и 0,024 мкмоль/мл активность IV комплекса возрастала на 37% и 23% соответственно (p<0,01).

Увеличение сопряжённости работы дыхательных комплексов отмечено только при концентрациях 0,0121 и 0,024 мкмоль/мл: отношение активности I и IV комплексов (I/IV) улучшилось на 12% и не изменилось; отношение активности I–III и IV комплексов (I–III/IV) улучшилось на 33% и 28%; отношение активности II–III и IV комплексов (II–III/IV) – на 33% и 30% соответственно указанным выше концентрациям (p<0,01). При концентрации убихинона 0,0024 мкмоль/л улучшение отношения активности I и IV комплексов составило 34%, однако I–III/IV и II–III/IV – практически не изменялось (6–8%), что может указывать на то, что эффективность работы дыхательной цепи под действием препарата («Куде-

сан») зависит от его концентрации: снижается при концентрациях 0,0024, 0,063 и 0,625 мкмоль/мл и возрастает при концентрациях цитохрома 0,0121 и 0,024 мкмоль/л. Но в целом, наилучшим (максимально приближенным к 1) было сопряжение активностей I–III и IV комплексов дыхательной цепи. Кроме того, отмечено увеличение отношения активности IV комплекса к концентрации магния при концентрациях убихинона («Кудесан») 0,0024, 0,0121, 0,024 мкмоль/мл соответственно на 11%, 53% и 48% (p<0,01). Отношение активности ЛДГ к активности дыхательных комплексов в диапазоне концентраций от 0,0024 до 0,024 мкмоль/мл снижалось по отношению к контролю на 16–60% (p<0,01) (при этом активность самой ЛДГ снижалась на 28–42%), Из этого можно заключить, что интенсивность анаэробных окислительно-восстановительных процессов снизилась, а аэробных возрасла, о чём свидетельствует рост активности дыхательных комплексов при действии CoQ₁₀ («Кудесан») в концентрациях 0,0024, 0,0121, 0,024 мкмоль/мл (табл. 2).

Активность антиоксидантных ферментов первой линии антиоксидантной защиты СОД и каталазы была снижена практически при всех изученных концентрациях убихинона, и лишь при концентрации 0,024 и 0,063 мкмоль/мл увеличение активности СОД составило 8–14%. Максимальное снижение активности СОД и каталазы нами были отмечены при концентрации убихинона 0,0024 мкмоль/мл соответственно на 21% и 32% (p<0,01).

Снижение активности СОД и каталазы может быть связано с несколькими причинами: а) с уменьшением утечек электронов из дыхательной цепи и, соответственно, снижением образования активных форм кислорода; б) с проявлением антиоксидантного действия убихинона или его метаболитов и витамина Е, входящего в состав препарата «Кудесан» (4,5 мг/мл); в) с влиянием поверхностно активного компонента препарата, переводящего CoQ₁₀ в водорастворимое состояние.

Таблица 2

Показатели, характеризующие эффективность работы дыхательной цепи лейкоцитов под действием различных концентраций CoQ («Кудесан»)

Параметр, единицы измерения	Концентрация коэнзима Q ₁₀ в мкмоль/мл				
	0,625	0,063	0,024	0,0121	0,0024
	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)	среднее значение (X±SD)
I/IV, отн. единицы	1,75±0,2*	4,58±0,4*	4,62±0,4	4,04±0,3**	6,18±0,6*
Контроль, отн. единицы	3,46±0,3	3,46±0,3	4,6±0,4	4,6±0,4	4,6±0,4
I–III/IV, отн. единицы	3,04±0,36**	2,5±0,3**	1,16±0,1*	1,07±0,1*	1,71±0,2
Контроль, отн. единицы	2,8±0,2	2,8±0,2	1,6±0,14	1,6±0,14	1,6±0,14
II–III/IV, отн. единицы	4,74±0,4*	3,52±0,3*	2,91±0,35*	2,81±0,23*	3,92±0,35
Контроль, отн. единицы	2,86±0,25	2,86±0,25	4,18±0,38	4,18±0,38	4,18±0,38
IV/Mg, отн. единицы	11,27±1*	14,83±1,3*	26,42±2,4*	31,46±3,8*	19,83±1,8*
Контроль, отн. единицы	15,4±1,4	15,4±1,4	17,9±1,6	17,9±1,6	17,9±1,6
ЛДГ/ IV, отн. единицы	209±25*	138±17*	107±13*	77±8*	123±15*
Контроль, отн. единицы	112±10	112±10	184±16	184±16	184±16
ЛДГ, МЕ/г белка	186±9	214±11*	291±15*	235±12*	264±13*
Контроль, МЕ/г белка	189±9	189±9	403±6	403±6	403±6

* – p<0,01; ** – p<0,05.

Практически при всех концентрациях кофермента Q₁₀ «Кудесан» обладает стимулирующим действием на метаболизм, на что указывает рост активности АСТ, АЛТ, ГГТ, ЩФ и липазы, и лишь при концентрации убихинона 0,625 мкмоль/мл активность указанных ферментов падала.

Кроме того, был проведен анализ биодоступности нескольких форм убихинона Q₁₀, в том числе восстановленного (данные в этой работе не приводятся). В качестве модели использовали эритроциты человека, в которых определяли активность глутатион-S-трансферазы (GST), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, содержание восстановленного глутатиона (GSH), показатели ПОЛ (по МДА), а также концентрацию исследуемого вещества в цитозоле и в мембранах. В экспериментах *in vitro* нами было установлено, что проницаемость мембран для убихинона (препарат «Кудесан») составила суммарно 20–25% (в мембранах 3–7%, в цитозоле 10–15%). При этом активность GST снижалась на 30–40%, тогда как изменение активности СОД, количества GSH и показателей ПОЛ в гемолизате зарегистрированы не были.

Заключение

Таким образом, наибольшим стимулирующим эффектом на энергетический метаболизм клетки CoQ₁₀ («Кудесан») в наших условиях обладал в концентрациях 0,0121 и 0,024 мкмоль/мл. При этом не только возрастала активность I и IV комплексов дыхательной цепи, но и эффективность работы всей митохондриальной цепи передачи электронов. Полученные нами данные позволяют сделать вывод об увеличении доли аэробных окислительно-восстано-

вительных процессов в энергетическом метаболизме клеток под воздействием указанных препаратов.

Литература

1. *Биохимия* : учебник / под ред. Е.С. Северина. – 4-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 784 с.
2. *Тодоров И.Н.* Стресс, старение и их биохимическая коррекция / И.Н. Тодоров, Г.И. Тодоров. М.: Наука, 2003. – 480 с.
3. *Quinzii C.M.* Human Coenzyme Q₁₀ Deficiency / C.M. Quinzii, S. DiMauro, M. Hirano // *Neurochem Res.* – 2007. – № 32. – P. 723–727.
4. *Atorvastatin* Decreases the Coenzyme Q₁₀ Level in the Blood of Patients at Risk for Cardiovascular Disease and Stroke / T. Rundek [et al.] // *Arch Neurol.* – 2004. – № 61. – P. 889–892.
5. *Littarru G.P.* Clinical aspects of coenzyme Q₁₀: An update / G.P. Littarru, L. Tiano // *Nutrition.* – 2010. – № 26. – P. 250–254.
6. *DiMauro S.* Mitochondrial respiratory-chain diseases / S. DiMauro, E.A. Schon // *Engl. J. Med.* – 2003. – № 348. – P. 2656–2668.
7. *Coenzyme Q₁₀* in Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders / M. Mancuso [et al.] // *Current Drug Targets.* – 2010. – № 11. – P. 111–121.
8. *Clinical presentation of respiratory chain deficiency* / A. Munnich [et al.] // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / ed. by C.R. Scriver [et al.]. – 8th Ed. – New York: McGraw-Hill, 2001. – P. 2261–2274.
9. *Coenzyme Q10*: an independent predictor of mortality in chronic heart failure / S.L. Molyneux [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – № 52. – P. 1435–1441.

10. *Сухоруков В.С.* Энерготропная терапия в современной педиатрии / В.С. Сухоруков, С.О. Ключников // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии. – 2006. – № 6. – С. 9–12.

11. *Сухоруков В.С.* Энергодефицитный диатез у детей / В.С. Сухоруков. – М.: Медпрактика-М, 2009. – 28 с.

12. *Методические основы экспериментальной работы в биохимической лаборатории: учебно-методическое пособие / Г.П. Дуже [и др.].* – СПб.: СПбГУ, 2008. – 102 с.

13. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учеб. пособие / под ред. М.И. Прохоровой.* – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с.

14. *Shinde S.* Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: Preliminary study / S. Shinde, K. Pasupathy // Neurology India. – 2006. – V. 54, № 4. – P. 390–393.

15. *Lowry O.H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1967. – № 32. – P. 415–438.