

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-12-20-24

СПОСОБНОСТЬ КОЭНЗИМА Q10 УВЕЛИЧИВАТЬ ГЕНЕРАЦИЮ ВОДОРОДА МИКРОБИОТОЙ КИШЕЧНИКА КРЫС КАК НОВЫЙ КОМПОНЕНТ В МЕХАНИЗМЕ РЕАЛИЗАЦИИ ЕГО АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ

А. Ю. Иванова^{1,2,*}, И. В. Широков³, Г. Н. Бондаренко¹, О. С. Медведев^{1,2}

Исследовали влияние коэнзима Q10 на скорость продукции газообразных метаболитов микробиоты кишечника — водорода и метана. Для оценки этого эффекта у крыс применяли дыхательный тест. В качестве нагрузки использовали дисахарид лактулозу, расщепляемый только микроорганизмами толстой кишки. Пероральный прием коэнзима Q10 в дозе 30 мг/кг в течение 21 дня вызывал у крыс увеличение генерации водорода, продуцируемого микробиотой кишечника, в 2 раза по отношению к исходному состоянию и составлял $87,64 \pm 9,31$ ppm · ч ($p = 0,0153$). Также в группе “Коэнзим Q10” наблюдалось снижение уровня метана, что говорит, возможно, о подавлении активности/роста метаногенных архей и большей сохранности водорода в микробиоте. Увеличение образования эндогенного водорода может быть дополнительным компонентом антиоксидантного влияния коэнзима Q10 на организм.

Ключевые слова: коэнзим Q10; антиоксидант; молекулярный водород; микробиота кишечника; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Коэнзим Q10 (CoQ10) — биологически активное липофильное соединение бензохиноновой структуры. CoQ10 синтезируется в организме из тирозина и мевалоновой кислоты и содержится в большинстве соматических клеток человека и других млекопитающих. Основная физиологическая роль CoQ10, как кофактора для комплексов I, II и III в электроно-транспортной цепи в митохондриях, хорошо известна: присутствие CoQ10 необходимо для синтеза АТФ в митохондриях для адекватного функционирования органов, особенно требующих больших энергозатрат (сердце, головной мозг). Также CoQ10 проявляет антиоксидантные свойства — предотвращает образование и распространение перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, защищая целостность клеточных мембран и ДНК от повреждения [3]. CoQ10 применяют в основном в качестве усилителя функции митохондрий, например, для предотвращения осложнений со стороны скелетной мускулатуры на фоне применения статинов,

а также антиоксиданта с целью уменьшения окислительного повреждения при широком спектре заболеваний (сердечно-сосудистых, эндокринных и др.).

Для препаратов CoQ10 преобладающим способом введения в организм является пероральный. Физико-химические свойства CoQ10, относительно высокая молекулярная масса, длинная изопреновая цепь ограничивают его абсорбцию в кишечнике. Биодоступность при приеме CoQ10 составляет около 2–3% [1], и для создания терапевтических концентраций CoQ10 в крови и органах-мишенях требуется длительное, до нескольких недель, его применение. Присутствие повышенных концентраций CoQ10 в просвете кишечника может создавать условия для изменения жизнедеятельности микроорганизмов. Показано, что соединения бензохиноновой структуры способны выполнять функцию ростового фактора для некоторых некультивируемых бактерий микробиома кишечника, т.е. в присутствии хинонов происходит стимуляция их роста [5]. Влияние CoQ10 на функциональные биомаркеры микробиоты кишки остается не изученным.

Микробиотой толстой кишки в результате ферментации сложных углеводов/пищевых волокон образуется достаточно много водорода — низкомолекулярного газообразного метаболита, обладающего, по последним данным, антиоксидантным действием [14]. Молекулярный водород способен связывать наиболее агрессивные активные формы кислорода — гидроксильный радикал (OH⁻) и пероксинитрит (ONOO⁻), а также увеличивать экспрессию эндогенных белков, таких как

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1.

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Россия, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а.

³ ФГБОУ Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана, Россия, 105005, Москва, ул. 2-я Бауманская, д. 5, стр. 1.

* e-mail: glf-inastya@yandex.ru

супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза, миелопероксидаза, глутатион-синтаза; проявлять цитопротекторные свойства, регулируя пути Nrf2-, ARE-, PI3K/Akt-, JAK2/STAT3-передачи сигналов внутрь клетки; снижать образование провоспалительных цитокинов [2].

Целью настоящей работы было изучение влияния CoQ10 в дозе 30 мг/кг (внутрижелудочно) на уровень низкомолекулярных газовых биомаркеров (водород и метан) ферментативной активности микробиоты кишечника крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на 22 аутбредных самцах-крысах линии Вистар (210 – 230 г). Все животные были получены из питомника лабораторных животных филиал “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Крысы соответствовали генетическому стандарту, что подтверждалось сертификатом качества. Перед началом эксперимента животных выдерживали на карантине на протяжении 2 недель, содержали в виварии в условиях 12-часового режима день/ночь, при температуре окружающей среды 22 – 23 °С, влажности 55 – 65 %, в клетках типа Т4 по 2 особи в каждой, с неограниченным доступом к корму и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с директивными документами [7]. Для оптимального проведения экспериментальных манипуляций и исключения влияния стресса на результаты исследования все животные предварительно подвергались процедуре хэндлинга.

Животные были рандомизированы на три группы: группа 1 — “Контроль”: введение очищенной воды; группа 2 — “Носитель”: введение растворителя “Кудесан форте” (ООО “Русфик”, Recordati S.p. A., Италия — 0 мг/кг коэнзима Q10); группа 3 — “Коэнзим Q10” введение коэнзима Q10 30 мг/кг в составе препарата “Кудесан Форте” (ООО “Русфик”, Recordati S.p. A., Италия). Все исследованные вещества вводились внутрижелудочно через зонд.

В состав препарата “Кудесан Форте” (1 мл) входят: коэнзим Q10 60 мг, витамин Е 6,8 мг, вода очищенная, макрогол глицерилгидроксистеарат, натрия бензоат, кислота лимонная, аскорбилпальмитат. Группа “Носитель” была введена дополнительно в связи с возможным модулирующим влиянием на микробиоту кишечника входящих в состав препарата “Кудесан Форте” вспомогательных веществ. В качестве базового рациона питания все крысы получали брикетированный корм для лабораторных животных “ЛБК-120” (Тосненский комбикормовый завод, Россия) без ограничений.

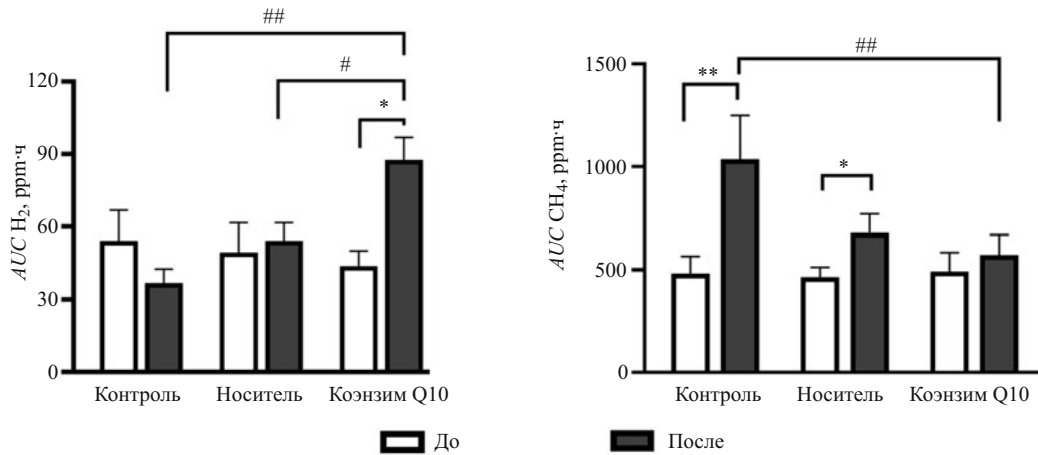
Продолжительность введения исследуемых веществ составила 21 день, их вводили ежедневно внутрижелудочно через зонд в 12:00 на фоне приема корма. Препарат “Кудесан форте” (группа 3) вводили из расчета 30 мг/кг, растворитель (группа 2) и очищенную воду (группа 1) вводили в эквивалентном объеме (не более 1 мл).

До начала эксперимента и после 21 дня воздействия исследуемых веществ у всех животных проводили оценку уровня газообразных метаболитов микробиоты (водорода и метана). После окончания исследования животных выводили из эксперимента с помощью ингаляции углекислого газа.

Оценку метаболической активности микробиоты кишечника проводили путем стимуляции ферментативной активности введением искусственного дисахарида лактулозы (4-*O*-β-D-галактопиранозил-D-фруктоза), не расщепляющегося и не всасываемого в тонкой кишке крыс и человека. Регистрацию концентрации газообразных метаболитов микробиоты (водорода и метана) в суммарной пробе воздуха (выдыхаемый воздух + флатус) осуществляли на фоне лактулозной нагрузки (лактулозный тест). Забор проб воздуха проводили по 7 временным точкам (0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 ч). Первое измерение проводили натощак. Затем внутрижелудочно вводили водный раствор лактулозы (Fresenius Kabl IPSUM S.r.l., Италия) из расчета 2 г/кг. По полученным результатам строили кривую “концентрация — время” для водорода и метана, вычисляли площадь под кривой $AUC_{0-8ч}$ (ppm · ч), которая отражает скорость генерации газа в течение 8 ч измерений. По окончании 21 дня введения исследуемых веществ проводили повторные измерения.

Для аккумуляции выделяемого крысой водорода и метана (выдыхаемый воздух + флатус) была сконструирована установка, аналогичной представленной в работе M. Gumbmann [8], в нашей модификации.

Установка состояла из стеклянного эксикатора объемом 1,8 л и системы жизнеобеспечения. В замкнутую систему циркуляции воздуха были последовательно включены 2 патрона, один из которых заполняли натронной известью для удаления CO₂, второй — гидрогелем для поглощения конденсата, образующегося в процессе дыхания животного. Для подачи кислорода в систему использовался U-образный манометр, заполненный минеральным маслом. При падении давления в системе, связанного с потреблением кислорода животным, кислород поступал в систему через манометр, поддерживая кислород на уровне 19 – 22 %, достаточного для обеспечения жизненно важных функций животного. Время, в течение которого крыса находилась в замкнутой системе, рассчитывали из свободного объема эксикатора и скорости воздухообмена крысы из табличных значений (27,27 ± 2,39 мл/мин · 100 г) [18]. Циркуляцию воздуха и контроль содержания кислорода обеспечивал прибор, изготовленный в ГУАП (Санкт-Петербург, Россия) и состоящий из насоса и кислородного датчика (ОКСИК-3) для контроля уровня кислорода в системе. Данное устройство обеспечивает поток воздуха со скоростью 400 мл/мин и оценивает концентрацию кислорода в потоке в диапазоне 0 – 100 % с разрешением 0,1 %. Приточно-вытяжная вентиляция обеспечивалась через 2 трубки из нержавеющей стали, вставленные в пробку эксикатора.



Площадь под кривой концентрации H₂ и CH₄ в выдыхаемом воздухе крыс (ppm · ч) в тесте с лактулозной нагрузкой.

Белые столбики — исходные значения показателей выделения водорода и метана в лактулозном тесте (до начала введения исследуемых веществ). Темно-серые столбики — значения показателей выделения водорода и метана в лактулозном тесте через 21 день введения исследуемых веществ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — статистически значимые отличия в экспериментальных группах в начале и в конце эксперимента; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ — статистически значимые отличия между группами в конце эксперимента.

По достижению расчетного времени нахождения крысы в эксикаторе пробу воздуха в объеме 1 мл отбирали газонепроницаемым стеклянным шприцом Hamilton через клапан, встроенный в поток циркуляции.

Измерение концентрации водорода и метана в пробе воздуха проводили методом газовой хроматографии (TRILyzer mBA-3000, Taiyo Instruments Inc., Япония). В качестве газа-носителя использовали поверочный нулевой газ воздух марки “А” (ТУ 6-21-5-82): кислород (O₂) (20,9 %) + азот (N₂) (ост.). Измерения проводили при скорости потока газа-носителя в системе хроматографа 30 мл/мин и температуре колонки 50 °С. При проведении калибровки использовали газовые воздушные смеси с объемными концентрациями водорода и метана по 5 ppm или по 50 ppm. Дополнительно, перед началом измерений проб от животного, проводили измерение концентрации водорода и метана в окружающем воздухе. Полученные значения учитывали при анализе пробы воздуха от животного.

Статистический анализ полученных результатов был выполнен с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 8. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для сравнения средних значений одного показателя у более чем двух выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ One-way ANOVA. Для того, чтобы установить одновременное влияние группы и продолжительности воздействия, а также взаимодействие между этими факторами, использовали двухфакторный дисперсионный анализ Two-way ANOVA при выявлении различий для попарного сравнения групп, использовали парный и непарный t-тест для анализа зависимых и независимых выборок соответственно. При парном сравнении групп с ненормальным распределением, для зависимых выбо-

рок использовали критерий Вилкоксона, для независимых — критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($Mean \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение газообразных метаболитов микробиоты кишечника в воздушной пробе у крыс на фоне лактулозной нагрузки (лактулозный дыхательный тест)

Изучение концентрации газов (водорода и метана) в течение 8 ч после введения натошак не расщепляемого в верхних отделах ЖКТ дисахарида лактулозы (лактулозная нагрузка) позволяет оценить функциональную активность микробиоты кишечника в отсутствие других пищевых факторов.

Сравнение площадей под кривыми (AUC) динамики концентрации водорода в суммарной воздушной пробе после лактулозной нагрузки выявило усиление выработки водорода в группе “Коэнзим Q10” в 2 раза по отношению к исходному состоянию и составило $87,64 \pm 9,31$ ppm · ч ($p = 0,0153$) (рисунок). По окончании эксперимента увеличение генерации водорода в группе “Коэнзим Q10” статистически значимо отличалось от уровня водорода в воздушной пробе животных в группах “Контроль” и “Носитель” ($p = 0,0014$ и $0,0416$ соответственно). Статистически достоверное увеличение динамики генерации метана было выявлено в группах “Контроль” — в 2,16 раза и “Носитель” — в 1,47 раза и составило $1036 \pm 214,6$ ppm · ч ($p = 0,0095$) и $679,6 \pm 91,36$ ppm · ч ($p = 0,0368$) соответственно. В конце эксперимента скорость выделения метана в группе “Контроль” была достоверно выше, чем в группе “Коэнзим Q10” ($p = 0,078$).

Основными причинами большего образования водорода при стандартном лактулозном дыхательном тесте натошак могут быть: большее образование водорода имеющимися видами микроорганизмов микробиоты, относительное увеличение водород продуцирующих бактерий, снижение потребления водорода *in situ*, в просвете кишечника гидрогенотрофными микроорганизмами, прежде всего метаногенными археями и рядом других (например, *Helicobacter pylori*).

Существенное значение в увеличении образования H_2 под влиянием CoQ10 может иметь подавление активности метаногенных микроорганизмов микробиоты. Используемые в наших опытах крысы характеризовались высоким содержанием метана в выдыхаемом воздухе и по этому критерию могут быть отнесены к группе высокометаногенных. Известно, что H_2 , образованный в результате ферментации преимущественно углеводов, используется для синтеза ацетата ацетогенными бактериями, для синтеза метана — метаногенными археями (это представляется основным потребителем H_2) и для синтеза сероводорода сульфат-редуцирующими бактериями. Для синтеза одной молекулы метана требуется 4 молекулы водорода [10]. Нами показано, что увеличение продукции H_2 происходит одновременно со снижением синтеза метана. Можно предположить, что CoQ10 угнетает активность или относительное количество метаногенных архей в микробиоте, что и сопровождается повышением уровня выдыхаемого H_2 . Подобное соотношение между уровнем водорода и метана хорошо описано в литературе для человека [6, 15].

Возрастание уровня H_2 в выдыхаемом воздухе не только является биомаркером ферментативной активности микробиоты кишки, но может иметь самостоятельное значение в повышении антиоксидантной защиты организма. В работе группы японских авторов во главе с S. Ohta было убедительно показано, что молекулярный водород является антиоксидантом, способным нейтрализовать наиболее активные формы кислорода — гидроксильный радикал (OH^\cdot) и пероксонитрит ($ONOO^-$) [14]. В последующие годы было опубликовано более 2000 научных статей, подтвердивших антиоксидантные свойства и показавших положительный эффект H_2 при ишемии/реперфузии головного мозга, печени [13] и сердца [12].

Водород, образуемый в результате ферментации углеводов микробиотой, как и CoQ10, всасывается в кровь, оттекающей от кишечника, и в максимальной концентрации по портальной системе поступает в печень. Именно поэтому есть основание сравнивать антиоксидантные эффекты водорода и CoQ10, на моделях ишемии/реперфузии печени, в патогенезе повреждений которой ключевую роль играет окислительный стресс [14]. N. Nishimura, et al. показали, что добавление субстрата для ферментации микробиотой (пектин) сопровождается увеличением продукции водорода крысами. Авторы обнаружили повышение concentra-

ции H_2 в крови портальной вены (в 4,8 раза при разбросе абсолютных концентраций от 4,5 до 11,5 мкмоль/л) и общий выход H_2 в 15,5 раза выше, по сравнению с контролем. Важно, что введение CoQ10 в дозе 100 мг/кг/день в течение 10 дней (в 3,3 раза более высокая доза, по сравнению с нашим исследованием) также способствовало снижению последствий ишемии/реперфузии печени [11].

Результаты нескольких научных работ подтверждают эффекты CoQ10 на уровне ЖКТ. На экспериментальной модели язвенного колита были показаны антиоксидантный и противовоспалительный эффекты коэнзима Q в дозе 30 мг/кг за счет повышения в тканях толстой кишки содержания глутатитона, активности каталазы, снижения уровня малонового диальдегида [4]. Обнаружено, что коэнзим Q хорошо аккумулируется в стенках кишечника на всем его протяжении при радиационном воздействии у мышей и защищает крипты от перекисного окисления и апоптоза [17]. Возможно, усиление активности ферментных антиоксидантов на фоне применения CoQ10 может частично быть связано с образованием эндогенного водорода микробиотой кишечника.

В литературе существуют указания на способность молекулярного водорода усиливать эффекты CoQ10 на уровне митохондрий [9]. В свете полученных нами данных можно предположить наличие положительной обратной связи с участием микробиоты кишечника, которая включает повышение образования водорода в кишечнике — всасывание в кровь — оказание усиливающего, стимулирующего действия CoQ10 на уровне митохондрий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные о способности коэнзима CoQ10, вводимого внутривенно крысам в дозе 30 мг/кг в течение 21 дня, могут повышать уровень водорода в выдыхаемом воздухе и указывать на новый, ранее неизвестный компонент в антиоксидантном эффекте коэнзима CoQ10. Одним из механизмов увеличения концентрации водорода микробиотой может быть подавление коэнзимом Q10 активности или количества метаногенных архей в составе микробиоты.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.т.н. Килимнику В. А. (ГУАП, Санкт-Петербург) за изготовление и предоставление нам устройства для измерения концентрации O_2 и CO_2 в экспериментальной камере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. С. Медведев, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(8), 41 – 44 (2009); *Pharm. Chem. J.*, **43**(8), 468 – 471 (2009); doi: 10.1007 / s11094-009-0330-z.
2. M. Barancik, B. Kura, T. LeBaron, et al., *Antioxidants*, **9**(12), 1281 (2020); doi: 10.3390 / antiox9121281.

3. M. Bentinger, K. Brismar, G. Dallner, *Mitochondrion*, **7**(Suppl.), 41 – 50 (2007); doi: 10.1016 / j.mito.2007.02.006.
4. M. G. Ewees, B. A. S. Messiha, A. A. Abo-Saif, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **39**(7), 1159 – 1166 (2016); doi: 10.1248 / bpb.b16-00124.
5. K. Fenn, P. Strandwitz, E. J. Stewart, et al., *Microbiome*, **5**(1), 161 (2017); doi: 10.1186 / s40168-017-0380-5.
6. K. Gottlieb, C. Le, V. Wachter, et al., *Gastroenterol. Rep. (Oxf.)*, **5**(3), 193 – 199 (2018); doi: 10.1093 / gastro / gow048.
7. *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, National Academic Press, Washington (1996).
8. M. R. Gumbmann, S. N. Williams, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**(4), 1771 – 1775 (1971); doi: 10.3181 / 00379727-137-35749.
9. A. Gvozdjáková, J. Kucharská, B. Kura, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **98**(1), 29 – 34 (2020); doi: 10.1139 / cjpgp-2019-0281.
10. R. Krajmalnik-Brown, Z. E. Ilhan, D. W. Kang, et al., *Nutr. Clin. Pract.*, **27**(2), 201 – 214 (2012); doi: 10.1177 / 0884533611436116.
11. A. R. Mahmoud, F. E. M. Ali, T. H. Abd-Elhamid, et al., *Tissue Cell*, **60**, 1 – 19 (2019); doi: 10.1016 / j.tice.2019.07.007.
12. C. Nie, X. Ding, M. Zheng, et al., *Life Sci.*, **272**, 119248 (2021); doi: 10.1016 / j.lfs.2021.119248.
13. N. Nishimura, H. Tanabe, Y. Sasaki, et al., *Br. J. Nutr.*, **107**(4), 485 – 492 (2012); doi: 10.1017 / S0007114511003229.
14. I. Ohsawa, W. Ishikawa, K. Takahashi, et al., *Nat. Med.*, **13**(6), 688 – 694 (2007); doi: 10.1038 / nm1577.
15. M. Pimentel, R. J. Saad, M. D. Long, et al., *Am. J. Gastroenterol.*, **115**(2), 165 – 178 (2020); doi: 10.14309 / ajg.0000000000000501.
16. T. Senoner, S. Schindler, S. Stattner, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **3950818**, 1 – 18 (2019); doi: 10.1155 / 2019 / 3950818.
17. Y. Shimizu, N. Mukumoto, N. Idrus, et al., *Adv. Radiat. Oncol.*, **4**(2), 237 – 245 (2019); doi: 10.1016 / j.adro.2019.01.006.
18. K. P. Strohl, A. J. Thomas, P. ST. Jean, et al., *J. Appl. Physiol.*, **82**(1), 317 – 323 (1997); doi: 10.1152 / jappl.1997.82.1.317.

Поступила 10.11.22

INCREASED HYDROGEN GENERATION BY GUT MICROBIOTA IN RATS AS A NEW FACET OF THE ANTIOXIDANT MECHANISM OF COENZYME Q10 EFFECT

A. Yu. Ivanova^{1,2,*}, I. V. Shirokov³, G. N. Bondarenko¹, and O. S. Medvedev^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

² National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, 121552 Russia.

³ Bauman Moscow State Technical University, Moscow, 105005 Russia

* e-mail: glf-inastya@yandex.ru

The effect of coenzyme Q10 on the rate of production of gaseous metabolites of gut microbiota – hydrogen and methane – was studied. The respiratory test was used to assess this function in rats. Lactulose disaccharide, which is degradable by colon microorganisms, was used as a load. Oral administration of coenzyme Q10 at a dose of 30 mg/kg for 21 days caused a 2-fold increase in the hydrogen generation produced by gut microbiota in rats relative to a baseline and was 87.64 ± 9.31 ppm · h ($p = 0.0153$). Moreover, the growth of methane was inhibited in the “Coenzyme Q10” group, which indicates, probably, the suppression of activity/growth of methanogenic Archea and higher preservation of hydrogen in the microbiota. The increase in the rate of endogenous hydrogen formation may be an additional component of the antioxidant effect of coenzyme Q10 on the organism.

Keywords: coenzyme Q10; antioxidant; molecular hydrogen; gut microbiota; rats.