

На правах рукописи

ШАПОВАЛ НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОЭНЗИМА Q10 НА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ
КОМПОНЕНТЫ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»)

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор
Доктор медицинских наук, профессор

Медведев Олег Стефанович
Салмина Алла Борисовна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий кафедрой молекулярной
фармакологии и радиобиологии
им. академика П.В. Сергеева МБФ
ФГАОУ ВО «Российский национальный
исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова»

Шимановский Николай Львович

Доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры фармакологии,
заведующая Центральной научно-исследовательской
лабораторией ФГБОУ ВО «Казанский
государственный медицинский университет»

Семина Ирина Ивановна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8 и на сайте www.academpharm.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность диссертационного исследования. Церебральные эндотелиоциты в составе нейроваскулярной единицы, включающей также перициты, астроциты, нейроны и микроглию, выступают основой для формирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) сосудов головного мозга (Abbott N. J. *Neurobiology of Disease*. 2010; 37; 1; P. 13–25, Obermeier V. *Nat Med*. 2013; 19; 12; P. 1584–1596). В настоящее время показано, что нарушение нормального функционирования клеток церебрального эндотелия, в том числе, нарушение функций митохондрий в клетках (Doll D. N. *Stroke*. 2015; 46; 6; P. 1681–1689) способно приводить к развитию нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний, в частности, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона (Кувачева Н. В. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013; 113; 4; С. 80).

Коэнзим Q₁₀, являясь неотъемлемым компонентом внутренней мембраны митохондрий, принимает участие в переносе электронов в транспортной цепочке окислительно-восстановительных процессов, в процессе обмена энергии, в реакции окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий клеток и тем самым играет важную роль в митохондриальном дыхании и антиоксидантной защите клеток организма (Shults C. W. *BioFactors*. 2005; 25; P. 117–126, Kumar A. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 124; P. 259–268, Neergheen V. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. 2017; 5; P. 1–8). Препараты коэнзима Q₁₀ за счет проявления нейропротекторного действия перспективны в лечении и профилактике ряда заболеваний, вызванных митохондриальными нарушениями (Matthews R. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95; P. 8892–8897, Santos G. C. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 45; 4; P. 607–618, Tatsuta Y. *Scientific Reports*. 2017; 7; 12990; P. 1-7). Известно, что коэнзим Q₁₀ способен проникать через ГЭБ (Isobe C. J. *Neurol*. 2010; 257; P. 399–404), но вопрос о механизме его проникновения остается открытым.

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке нет лекарственных форм коэнзима Q₁₀, предназначенных для внутривенного введения. Известно, что при приеме внутрь коэнзим Q₁₀ обладает низкой биодоступностью (Zhang Y. *The Journal of Nutrition*. 1995; 3; 125; P. 446–453), и тем самым исследования лекарственной формы для внутривенного введения представляют большой научный интерес в связи с потребностью решения вопросов быстрой доставки высокой концентрации вещества в головной мозг.

Таким образом, изучение действия коэнзима Q₁₀ на клетки церебрального эндотелия является важным направлением в нейрофармакологии, открывающим новые перспективы для решения вопроса управления проницаемостью ГЭБ, предотвращения развития нейровоспаления и нейродегенерации.

Степень разработанности проблемы. На кафедре фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова проведен ряд исследований по изучению коэнзима Q₁₀, в частности, исследована его нейропротекторная эффективность на моделях ишемии/реперфузии и хронической ишемии головного мозга крыс, а также влияние на жизнеспособность нейронов в условиях острой нормобарической гипоксии *in vitro*. В работах кафедры приводятся данные об исследованиях фармакокинетики коэнзима Q₁₀ на крысах после введения препарата Кудесан® в дозе 30 мг/кг и инновационного препарата коэнзима Q₁₀ (1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола) в дозе 10 мг/кг (Белоусова М.А. Диссертация на соискание ученой степени к.м.н. 2015; Куляк О.Ю. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. 2018). Разработан убихинол для внутривенного введения АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Эффективность его изучалась при различных патологических состояниях, в том числе ишемическом инсульте. Но при этом данных о влиянии препарата на эндотелиальные компоненты ГЭБ в норме нет. Поэтому продолжением исследований стало изучение фармакокинетики препаратов 1% водных растворов солюбилизированных убихинона и убихинола в дозе 30 мг/кг и их влияния на эндотелиальные компоненты ГЭБ в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Цель исследования. Изучить влияние окисленной и восстановленной форм коэнзима Q₁₀ (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эндотелия ГЭБ в условиях *in vitro* и клетки церебрального эндотелия в структурах гиппокампа, миндалина и коры головного мозга крыс в экспериментах *in vivo*.

Задачи исследования.

1. Оценить влияние убихинона (CoQ₁₀) и убихинола (CoQ₁₀H₂) в диапазоне концентраций 1, 5, 10 мкМ в течение 15, 120, 480 мин на проницаемость модельного ГЭБ путем регистрации трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) клеток церебрального эндотелия в условиях *in vitro*.
2. Провести оценку экспрессии факторов, влияющих на обеспечение барьерной функции ГЭБ - Rac-1, GSK-3β, ZO-1 при действии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки ГЭБ в диапазоне концентраций 1, 5, 10 мкМ в течение 15, 120, 480 мин в условиях *in vitro*.
3. Определить редокс-статус коэнзима Q₁₀ в головном мозге крыс после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).
4. Оценить экспрессию маркеров компонентов ГЭБ CD31, Pgp, CLDN5, GSK-3β, показывающих целостность барьера, его трансцеллюлярную и парацеллюлярную проницаемость и метаболический статус клеток ГЭБ методом

иммуногистохимического анализа срезов головного мозга крыс после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 30 мг/кг.

5. Оценить апоптоз в клетках церебрального эндотелия на срезах головного мозга крыс после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 30 мг/кг.

Научная новизна исследования. Впервые экспериментально показана вовлеченность коэнзима Q_{10} в процессы регуляции проницаемости ГЭБ. Показано повышение проницаемости ГЭБ при действии CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 1 мкМ и снижение проницаемости ГЭБ при действии $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 10 мкМ на клетки модели ГЭБ *in vitro*.

Впервые показана способность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ снижать количество Rac-1 -иммунопозитивных клеток в модели ГЭБ *in vitro*.

Впервые исследовано действие $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 1% раствора для внутривенного введения в дозе 30 мг/кг на крысах. При этом показано, что после его однократного введения увеличивается количество иммунопозитивных клеток CD31 в коре и миндалине, увеличивается количество иммунопозитивных клеток Pgp в гиппокампе и снижается в миндалине, увеличивается количество иммунопозитивных клеток CLDN5 в коре и снижается в гиппокампе и миндалине и снижается интенсивность апоптоза в энторинальной коре, гиппокампе и миндалине головного мозга крыс без модели патологических нарушений.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования. Полученные результаты дополняют и расширяют имеющиеся сведения о коэнзиме Q_{10} , в частности, о его влиянии на клетки церебральных эндотелиоцитов ГЭБ, включая действие восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$), предназначенной для внутривенного введения. Эти данные помогут оценить действие коэнзима Q_{10} на структуры головного мозга, в частности на ГЭБ и приблизиться к пониманию механизма действия препарата и его способности управлять проницаемостью ГЭБ.

Методы исследования и его дизайн. В диссертационной работе применялись физиологические и иммуногистохимические методы исследования. Дизайн исследования согласуется с принципами проведения экспериментов на лабораторных животных и проведения аналитических исследований. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Работы с использованием животных осуществлялись в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные

исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Коэнзим Q₁₀ оказывает влияние на проницаемость ГЭБ в трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. Эффекты CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ различаются и являются время- и дозозависимыми.
2. CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ модулируют количество иммунопозитивных клеток Rac-1 в модели ГЭБ, регулируя проницаемость ГЭБ.
3. Частичное окисление CoQ₁₀H₂ при поступлении из крови в мозг до уровня эндогенного тканевого редокс-баланса, отражает включение препарата в локальные окислительно-восстановительные процессы, что доказывает способность CoQ₁₀H₂ при внутривенном введении быстро и эффективно повышать антиоксидантный резерв тканей головного мозга.
4. При действии CoQ₁₀H₂ в коре и миндалине головного мозга крыс инициируются процессы неоангиогенеза, ассоциированные с барьерогенезом и улучшается клеточная адгезия. Увеличение экспрессии Pgr через 96 ч после введения CoQ₁₀H₂ показывает, что изменение экспрессии Pgr имеет индуцибельный характер.
5. CoQ₁₀H₂ снижает интенсивность апоптоза в клетках головного мозга здоровых крыс.

Степень достоверности данных. Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием современных стандартных экспериментальных методов, достаточной величиной и однородностью выборок объектов эксперимента, применением адекватных методов статистической обработки. При подготовке обзора литературы и обсуждении результатов использована современная и актуальная литература по теме диссертационного исследования.

Апробация результатов исследования. Данные были представлены на заседании кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на 28-ом Международном съезде Европейского общества по изучению гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, Барселона, Испания, 8-11 июня 2018 года и Российско-Японском симпозиуме, Красноярск, Россия, 20 сентября 2018 года.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 7 работ, включая 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них все 5 статей в индексируемых базах данных Web of Science, Scopus, и 2 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Личный вклад автора. Автор непосредственно выполняла анализ данных литературы по теме диссертационной работы, проводила экспериментальные исследования, анализ и обобщение полученных результатов, участвовала в подготовке и публикации статей и тезисов докладов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, от экспериментально-теоретической реализации поставленных задач до обсуждения результатов в научных публикациях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста, где представлены введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, список литературы и благодарности. Диссертационная работа также включает 2 таблицы, 20 рисунков. Список используемой литературы содержит 144 источника, из них 124 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и методы исследования. Исследование состояло из двух экспериментальных частей *in vitro* (с использованием клеточных культур астроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток) и *in vivo* (на экспериментальных животных).

Исследуемые препараты. Производитель АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Директор М.Н. Макарова, г. Санкт-Петербург: 1. Убихинон, раствор для внутривенного введения 10 мг/мл (1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинона); 2. Убихинол, раствор для внутривенного введения 10 мг/мл (1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола); 3. Растворитель (плацебо раствора убихинола).

Эксперименты *in vitro*. Эксперименты *in vitro* выполнены на кафедре биохимии с курсом медицинской химии и НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. Использование экспериментальных животных в КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого было одобрено биоэтической комиссией Локального этического комитета КрасГМУ (протокол №7 от «12» декабря 2011 г). Исследования проведены на трехклеточной модели ГЭБ в условиях *in vitro* (Хилажева Е. Д.; Цитология. 2015; 57(10); С. 710). В состав модели ГЭБ входило три вида клеток: нейроны, астроциты, эндотелиальные клетки. Источником прогениторных клеток для получения нейронов и астроцитов служили клетки головного мозга новорожденных крыс (4 суток после рождения – P4). Прогениторные клетки головного мозга культивировали с формированием нейросфер. После образования достаточного количества нейросфер проводили их дифференцировку в нейроны и астроциты. Эндотелиальные

клетки изолировали из сосудов паренхимы головного мозга крыс (P10). Все работы проводили на льду в стерильных условиях.

Получение нейросфер, а далее дифференцировку нейросфер в нейроны и астроциты выполняли по протоколу получения и дифференцировки нейросфер и первичной культуры нейронов и астроцитов (Khilazheva E.D.; Cell Tiss. Biol. 2015; 9(6); P. 447). Выделение и получение первичной культуры эндотелиальных клеток из микрососудов головного мозга крыс проводили в соответствии с протоколом изолирования и культивирования церебральных эндотелиальных клеток (Liu Y.; Microvasc. Res. 2013; 90; P. 199).

После образования монослоев клеток астроцитов, нейронов и эндотелиоцитов проводилось создание из них трехклеточной модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*. Модель ГЭБ формировали в культуральном 24-луночном планшете со вставками. Астроциты и нейроны помещали на дно лунки планшета, эндотелиоциты на внутреннюю поверхность культуральной вставки с добавлением культуральной среды. Культивирование продолжалось в течение 2 суток в стандартных условиях CO₂-инкубатора. После образования монослоев на дне лунок и во вставках, культуральные вставки с эндотелиоцитами помещали в лунки планшета, в которых были астроциты и нейроны. Культивировали в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

После формирования ГЭБ из сокультуры клеток, проводилась их инкубация с исследуемыми препаратами. Для проведения исследования были определены следующие экспериментальные группы: группа клеток модели ГЭБ в планшетах, во вставки которых добавляли 1%-ный раствор CoQ₁₀ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ и инкубировали в течение 15, 120 и 480 мин; группа клеток модели ГЭБ в планшетах, во вставки которых добавляли 1%- раствор CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ (Duran-Prado M.; PLoS One. 2014; 9(10); P. 1–13, Shapoval N.; Hypertension. 2018; 36; P. 149) и инкубировали в течение 15, 120 и 480 мин. В качестве контрольных групп выступали следующие: контрольная группа (К) была представлена клетками модели ГЭБ, к которым добавляли питательную среду DMEM в объемах эквивалентных концентрациям препаратов (86, 430 и 860 мкл); контрольная группа с плацебо (растворителем, который использовали для разведения исследуемых препаратов) – группа клеток модели ГЭБ в планшетах, во вставки которых добавляли растворитель (Р) в объемах эквивалентных концентрациям препаратов (86, 430 и 860 мкл).

По истечении времени инкубации проводили оценку структурно-функциональной целостности монослоя эндотелиальных клеток во вставках планшетов путем измерения трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС), с использованием вольтметра EVOM2 (World Precision Instruments, США) с электродами STX2 с

предварительной калибровкой в культуральной среде с культуральной вставкой. Далее клетки фиксировали для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров ГЭБ проводили методом двойного непрямого иммунофлуоресцентного мечения. Окрашивание ядер клеток проводили красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). Для регистрации целевых молекул использовали первичные антитела Rac-1 (ab33186, Abcam, Великобритания) в разведении 1:50, ZO-1 Polyclonal Antibody (MBS448025, MyBioSource, США) в разведении 1:300, GSK-3 β (GP158772-3, Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:300. Вторичными антителами являлись моноклональные антитела, меченные флюорохромом Alexa Fluor 488, (ab150117, Abcam, Великобритания) в разведении 1:100, Alexa 555 (ab150134, Abcam, Великобритания) в разведении 1:300. Микроскопия и подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих данный антиген клеток (не менее чем 500 клеток в образце при анализе не менее 5 полей зрения) осуществлялись на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). При обработке результатов учитывали относительное количество всех клеток, несущих интересующую метку, выраженное в процентах от общего количества клеток. Подсчет меток производили в программе ImageJ (версия 1.52p).

Эксперименты *in vivo*. Работу проводили на экспериментальных животных – крысах-самцах Wistar (n = 25) с массой тела 300-350 г, полученных из питомника Столбовая НЦБМТ ФМБА России, в соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и разрешением комитета по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Всех животных содержали в отдельном виварии в условиях 12-часового режима день/ночь, с неограниченным доступом к еде и воде. Перед всеми манипуляциями животных выдерживали на карантине не менее 7 суток. Для наркоза применяли хлоралгидрат (ХИММЕД, Россия), внутривентрально, в дозе 300 мг/кг.

Экспериментальной группе животных вводили 1% раствор убихинола (CoQ₁₀H₂) однократно внутривенно в дозе 30 мг/кг с использованием полипропиленового катетера, вживленного в бедренную вену животного. Контрольной группе (К) вводили физиологический раствор. Образцы головного мозга и крови брали у животных, которым вводили препарат через 2, 24, 96 и 192 ч после его введения (Shapoval N.; Hypertension. 2018; 36; P. 149), используя по 5 животных на каждую временную точку. По истечении времени проводили эвтаназию животных с помощью передозировки наркоза (хлоралгидрат, внутривентрально) и извлекали головной мозг. У мозга отсекали мозжечок и делили на ипси- и контралатеральные полушария, проводили пробоподготовку одной части, а вторую помещали в 10% формалин (срок хранения проб до анализа не превышал 3 недели).

Для полученных образцов проводилась оценка окислительно-восстановительного статуса (редокс-статуса) при определении тканевого содержания коэнзима Q₁₀ в головном мозге крыс. Анализ тканевого содержания CoQ₁₀ проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием по методике (Kalenikova E. I.; *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018; 51(11); P. 949–953). Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc.», (США). Для оценки редокс-статуса экстракт, полученный из образцов, анализировали до и после полного восстановления до CoQ₁₀H₂ (с помощью добавления раствора натрия тетрагидробората в этаноле). Также смотрели уровни CoQ₁₀H₂, регистрируемые до восстановления, соответствовали концентрации нативного, неокисленного препарата в плазме крови крысы. Добавление восстановителя переводило окисленную форму в восстановленную и позволяло определить общую концентрацию CoQ₁₀ в плазме. Редокс-статус CoQ₁₀ рассчитывали, как отношение концентрации CoQ₁₀H₂ к общей концентрации CoQ₁₀ в пробе (%).

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров ГЭБ проводили на свободноплавающих срезах по стандартной методике одновременного комбинированного окрашивания препарата (протоколы для свободноплавающих срезов фирмы Abcam, Великобритания). Срезы мозга делали на микротоме толщиной 100 мкм. Перед окрашиванием образцов проводилось демаскирование срезов (вначале обработкой протеиназой К в концентрации 50 мкг/мл и инкубированием в течение 5 мин в термостате при температуре 37°C, а затем нагреванием срезов в микроволновой печи в дистиллированной воде в течение еще 5 мин). Неспецифическую активность блокировали 2-часовой инкубацией при комнатной температуре в промывочном растворе (0.2% Тритона X-100 в PBS). Далее проводили инкубацию срезов с первичными антителами в течение ночи при 4°C в растворе PBS, содержащем 0.2% Тритона X-100 и 3% BSA (AB-раствор), а затем 2 ч при комнатной температуре. Использовали антитела против CD31 в разведении 1:200 (550300, Becton Dickinson, США), Monoclonal AntiP-Glycoprotein (MDR) (Pgp) в разведении 1:200 (R7965, Sigma-Aldrich, США), CLDN5 (H-52) в разведении 1:100 (SC-28670, Santa Cruz Biotechnology, США) и против GSK-3β в разведении 1:500 (GP158772-3, Sigma-Aldrich, США). Инкубацию с вторичными антителами Alexa Flour 488 и Alexa Flour 555 (ab150117 и ab150134 соответственно; Abcam, Великобритания) в разведении 1:2500 проводили в AB-растворе 2 ч при комнатной температуре. Оценка уровня апоптоза в церебральных эндотелиоцитах проводилась методом TUNEL при помощи набора реактивов 17-141 TUNEL Apoptosis Detection Kit (Abcam, Великобритания) в соответствии со

стандартным протоколом фирмы-производителя. После окрашивания образцов срезы переносили на стекло и наносили на срез 15 мкл монтирующей жидкости (50% глицерин в PBS, содержащий краситель DAPI в концентрации 2 мкг/мл). Препарат накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Исследуемыми участками головного мозга были зубчатая извилина гиппокампа, базолатеральная часть миндалина и энторинальная кора (Tatsuta et al., 2017). Микроскопию образцов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США) и полностью автоматизированный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus FV10i-W (Olympus, Япония). При анализе фотоснимков использовали программу ImageJ (версия 1.52р). Считали относительное количество клеток (в %), имеющих соответствующие антигены, от общего числа клеток в поле зрения (анализировали не менее 5 полей зрения).

Статистическую обработку результатов измерения ТЭС и ВЭЖХ анализа проводили в программе Statistica for Windows 6.0. с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. При статистической обработке остальных данных, полученных в исследованиях *in vitro* и *in vivo* использовали программу Prism 7 (GraphPad Software, США) и методы непараметрической статистики, применяя критерий Краскела-Уоллиса для сравнения показателей в независимых выборках с последующими попарными сравнениями. Различия принимали значимыми при $p \leq 0.05$. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение, p – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на проницаемость ГЭБ в условиях in vitro.

Оценка проницаемости ГЭБ проводилась путем измерения величины ТЭС. При высоких показателях ТЭС проницаемость ГЭБ ниже и наоборот, чем ниже значения ТЭС, тем выше проницаемость ГЭБ. В ходе исследования наблюдалось дозозависимое изменение величины ТЭС в экспериментальных группах при действии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ относительно величины ТЭС до добавления препаратов (Таблица 1).

При добавлении в культуральную среду CoQ₁₀ в концентрации 1 мкМ ТЭС статистически значимо снизилось после 120 мин действия на 13,7% и на 11% после 480 мин относительно исходной точки. CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ статистически достоверно снижал ТЭС через 120 мин на 15,9%, а через 480 мин наблюдения величина ТЭС достигла уменьшения на 17,5%. В концентрации 10 мкМ CoQ₁₀H₂ статистически значимо повышает ТЭС на 16,9% после 15 мин его воздействия.

Таблица 1. ТЭС после воздействия CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ на клетки модели ГЭБ

	Измерения до добавления вещества - К		Концентрация (мкМ)	Измерения после добавления вещества		
t (мин)	0			15	120	480
ТЭС (Ом*см ²) ± SD	162,44±12,81	CoQ ₁₀	1	158±5,94	140,25±10,53*	144,5±6,19*
			5	174,75±11,84	147,5±5,74	147±6,98
			10	168,5±5,8	146,5±5,45	151,5±3
	155,44±13,58	CoQ ₁₀ H ₂	1	156±3,37	130,75±6,99*	128,25±5,74*
			5	166,75±6,24	153,25±3,77	139,5±5,57
			10	181,75±7,63*	162,5±7,59	147,75±5,62

* – p ≤ 0.05, (p – уровень значимости, непараметрический U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 2. ТЭС после воздействия растворителем на клетки модели ГЭБ

	Измерения до добавления вещества - К		Объем (мкл)	Измерения после добавления вещества		
t (мин)	0			15	120	480
ТЭС (Ом*см ²) ± SD	190,67±14,99	Растворитель	86	189,75±5,91	199±7,39	180±6,68
			430	189,75±4,57	196,5±19,26	173,5±13,96
			860	186,75±12,42	186,75±19,64	177,25±6,02

* – p ≤ 0.05, (p – уровень значимости, непараметрический U-критерий Манна-Уитни).

В группе Р (Таблица 2), которая являлась контрольной группой, так как в этом случае использовали плацебо-раствор (без растворенных в нем субстанций исследуемых препаратов), статистически значимых изменений величины ТЭС не наблюдалось, что исключает возможность влияния использованного растворителя на проницаемость клеток модели ГЭБ.

Экспрессия белка Рас-1 на трехклеточной модели ГЭБ и монослой клеток эндотелия *in vitro*. При оценке изменения количества Рас-1-иммунопозитивных клеток при воздействии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ и на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ *in vitro* выявлено, что обе формы коэнзима Q₁₀ вызвали статистически значимое уменьшение количества эндотелиальных клеток, которые экспрессируют белок Рас-1 по сравнению с группами К и Р (Рис. 1). Статистически значимо по сравнению с контрольной группой (К), где значение экспрессии Рас-1 составляло 31,8%, было снижение экспрессии после 15 мин действия CoQ₁₀ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ до 2,66%, 1,65% и 1,63%, соответственно. По истечении 120 мин действия CoQ₁₀ в концентрации 1 мкМ зафиксировано достоверное снижение экспрессии маркера Рас-1 до 1,12% по сравнению с К (24,73%). Статистически значимо от К (31,8%) уменьшалась экспрессия Рас-1 под влиянием CoQ₁₀H₂ в

концентрациях 1, 5 и 10 мкМ после 15 мин действия до 3,86%, 2,1% и 1,04%, соответственно, а после 120 мин до 1,75%, 1,22% и 1,14%, соответственно, относительно К (24,73%). Статистически значимо отличалась группа Р от К (12,99%) при действии растворителя в объемах 86 и 860 мкл через 480 мин и значения составили 85,68% и 39,9%, соответственно. Других статистических отличий между группами К и Р не было. Статистически достоверных отличий между действием CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп.

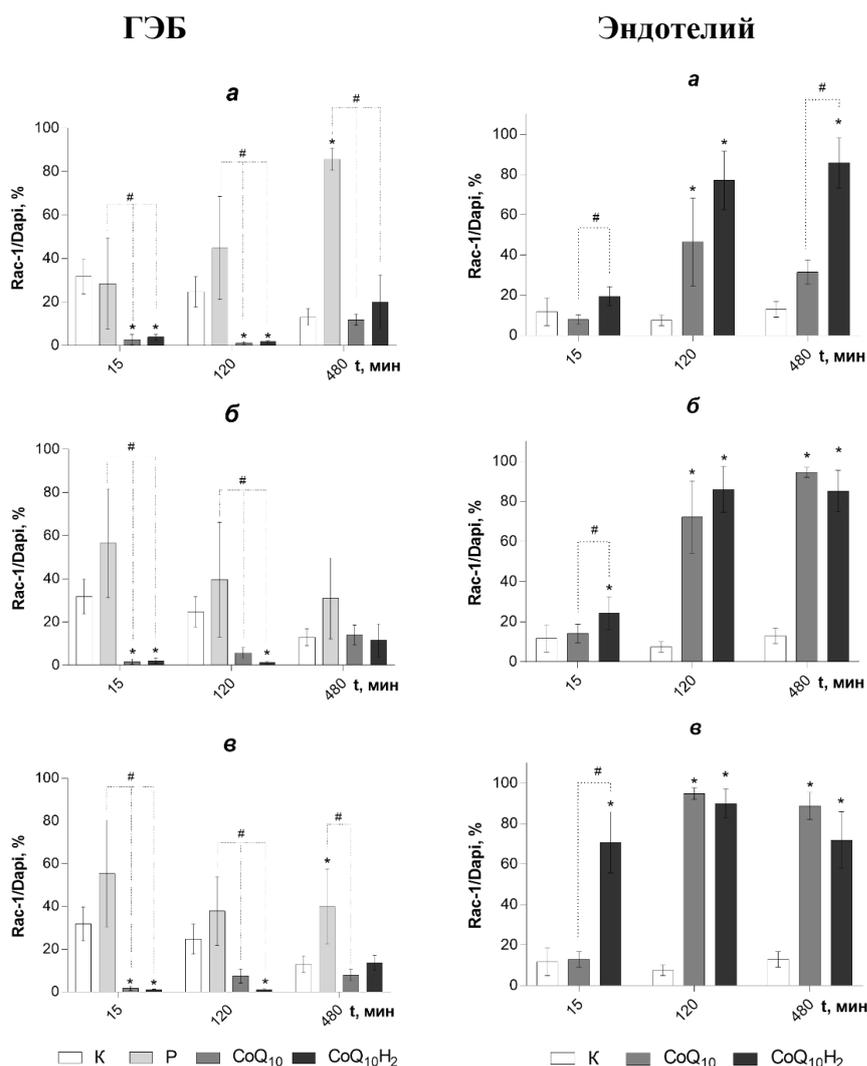


Рис. 1. Влияние CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1 (а), 5 (б) и 10 мкМ (в) на экспрессию белка Rac-1 в клетках эндотелия в модели ГЭБ (слева) и в монослое эндотелия (справа) в зависимости от времени инкубации. * – статистически значимые отличия от контроля (К); # – статистически значимые отличия от плацебо-контроля (Р) и между группами препаратов; p ≤ 0.05 (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Для полной оценки влияния CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ также проводилась оценка экспрессии белка Rac-1 после воздействия

препаратами на монокультуру клеток церебрального эндотелия в аналогичных условиях. В отличие от модели ГЭБ *in vitro* в этом случае отсутствовало взаимодействие эндотелиальных клеток с нейронами и астроцитами. Эффекты CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки церебрального эндотелия (вне модели ГЭБ) отличались от тех, которые наблюдали при влиянии веществ на клеточную модель ГЭБ *in vitro* (Рис. 1). Статистически значимым по сравнению с группой К (7,52%) было увеличение экспрессии белка Rac-1 при действии CoQ₁₀ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ в течение 120 мин до 46,42%, 72,15% и 94,77%, соответственно, и в концентрациях 5 и 10 мкМ после 480 мин действия до 94,5% и 88,74%, соответственно, относительно К (12,99%). Статистически значимо от К (11,76%) увеличивалась экспрессия Rac-1 под влиянием в течение 15 мин CoQ₁₀H₂ в концентрациях 5, 10 мкМ до 24,23%, 70,69%, соответственно, и в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ после 120 мин действия до 77,13%, 85,98% и 89,91%, соответственно, относительно К (7,52%), а после 480 мин до 84,7%, 85,22% и 71,95%, соответственно, относительно К (12,99%). Отличия значений экспериментальных групп были статистически значимыми между группой в концентрации 1 мкМ через 15 и 480 мин; в концентрациях 5 и 10 мкМ только по истечении 5 мин.

Оценка экспрессии GSK-3 β и ZO-1 на трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. По результатам иммуногистохимического анализа GSK-3 β экспрессирующего маркера, проводимого *in vitro* на трехклеточной модели ГЭБ (Рис. 2), установлено, что статистически значимо от К (29,2%) увеличивалась экспрессия GSK-3 β при действии в течение 15 мин CoQ₁₀H₂ в концентрации 10 мкМ до 58,68%; после 120 мин в концентрации 5 мкМ – до 96,65%, относительно К (76,86%) и после 480 мин действия в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ – до 99,21%, 92,26% и 92,01%, соответственно, относительно К (38,15%). Статистически значимо от К (29,2%) увеличивалась экспрессия GSK-3 β под влиянием растворителя (Р) в объемах 86, 430, 860 мкл в течение 15 мин до 84,14%, 75,59% и 59,63%, соответственно; после 120 мин в объемах 86, 430 мкл – до 97,07%, 96,37%, соответственно, относительно К (76,86%) и после 480 мин действия в объемах 430, 860 мкл – до 93,72%, 93,8%, соответственно, относительно К (38,15%). От группы Р статистически значимо отличалось влияние 1 и 5 мкМ CoQ₁₀H₂ в течение 15 мин.

По результатам иммуногистохимического анализа ZO-1 экспрессирующего маркера, проводимого *in vitro* на трехклеточной модели ГЭБ (Рис. 2), установлено, что статистически значимо по сравнению с К (32,99%) увеличивалась экспрессия ZO-1 под влиянием в течение 15 мин CoQ₁₀H₂ в концентрации 10 мкМ до 55,57%; после 120 мин действия в концентрации 5 мкМ – до 99,08%, относительно К (60,59%) и после 480 мин в концентрациях 1, 5 и 10

мкМ – до 98,99%, 89,11% и 93,26%, соответственно, относительно К (34,42%). Статистически значимо относительно К (32,99%) фиксировалось увеличение экспрессии ZO-1 при действии растворителя в объемах 86, 430, 860 мкл в течение 15 мин до 74,91%, 78,51%, 53,41%, соответственно; после 120 мин в объемах 86, 830 мкл – до 96,81%, 92,64%, соответственно, по отношению к К (60,59%) и после 480 мин действия в объемах 430, 860 мкл до 94,9%, 91,52%, соответственно, по отношению к К (34,42%). От группы Р статистически значимо отличалось действие $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в течение 15 мин в концентрациях 1 и 5 мкМ.

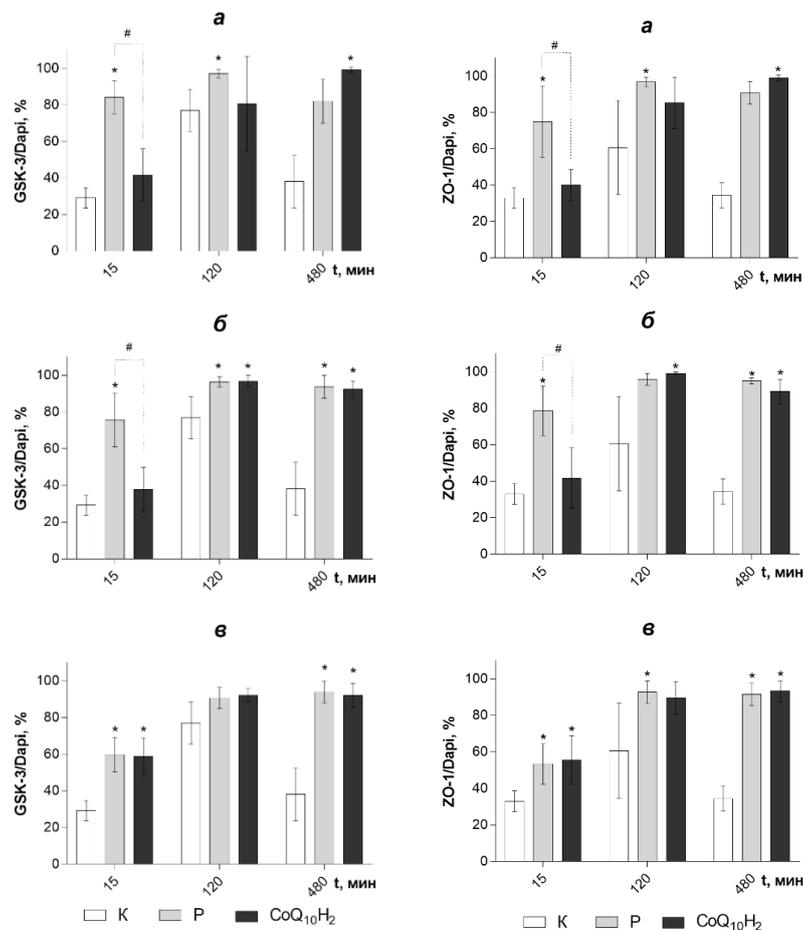


Рис. 2. Влияние $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрациях 1 (а), 5 (б) и 10 мкМ (в) на экспрессию белка GSK-3β (слева) и ZO-1 (справа) в клетках эндотелия в модели ГЭБ в зависимости от времени инкубации. * – статистически значимые отличия от контроля (К); # – статистически значимые отличия от плацебо-контроля (Р); $p \leq 0.05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Таким образом, по исследованиям в части экспериментов *in vitro* получено, что CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ оказывают влияние на эндотелиальные клетки в модели ГЭБ (Таблица 3). Поскольку ТЭС является интегральным показателем целостности ГЭБ (Srinivasan et al., 2015), полученные данные, подтверждают изменения проницаемости ГЭБ при воздействии

CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂. При этом действие CoQ₁₀H₂ является дозозависимым и при концентрации 1 мкМ ТЭС уменьшается, что соответствует повышению проницаемости ГЭБ, а при концентрации 10 мкМ ТЭС увеличивается, что может свидетельствовать о снижении проницаемости ГЭБ, таким образом, CoQ₁₀H₂ в разных концентрациях оказывает разное влияние на проницаемость ГЭБ. В отношении CoQ₁₀ можно заключить, что при концентрации 1 мкМ его влияние на величину ТЭС заключается в уменьшении этого показателя, то есть в увеличении проницаемости ГЭБ. При более высоких концентрациях отмечается тенденция к дальнейшему повышению проницаемости ГЭБ.

Таблица 3. Влияние CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ *in vitro* на клетки эндотелия в модели ГЭБ

	CoQ₁₀	CoQ₁₀H₂
Проницаемость ГЭБ	↑ (1 мкМ)	↑ (1 мкМ); ↓ (10 мкМ)
Rac-1+-клетки	↓ (1, 5, 10 мкМ)	↓ (1, 5, 10 мкМ)
ZO1+-клетки	не измерялось	↑ (1, 5, 10 мкМ)
GSK-3β+-клетки	не измерялось	↑ (1, 5, 10 мкМ)

Белок Rac-1 является полифункциональным белком. Rac-1 играет большую роль в регуляции активности белков цитоскелета и в организации сигнальных путей, регулирующих сборку актинового цитоскелета, процессы адгезии эндотелиальных клеток, их парацеллюлярную и трансцеллюлярную проницаемость (Hall A.; Science. 1998; 279; P. 509, Ridley A. J.; FEBS Lett. 2001; 498; P. 168). Rac-1 вызывает повышенную нуклеацию и полимеризацию актина за счет связывания с двумя эффекторами – PI-4-P5K и WAVE. Активация PI-4-P5K приводит к росту внутриклеточного уровня фосфатидил-инозитидов, которые связывают кэпирующие белки и тем самым способствуют удлинению актиновых микрофиламентов (Machesky L.M.; Curr. Biol. 1998; 8; P. 1347, Tolia K. F.; Curr. Biol. 2000; 10; P. 153). Активированный Rac-1 (Rac-GTP) стимулирует фермент НАДФ•Н-оксидазу (NOX), что приводит к усилению продукции АФК (Sundaresan M.; Biochem. J. 1996; 318; P. 379). Высокие уровни экспрессии Rac-1 клетками ГЭБ, ассоциированы с повреждением и повышением проницаемости ГЭБ, усилением апоптоза клеток и митохондриальной недостаточностью (Kahles T.; Stroke. 2007; 38; P. 3000, Naci D.; Sci. Rep. 2019; 9; P. 19455). Таким образом, CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂, снижая количество Rac-1-иммунопозитивных клеток, способствует укреплению барьерных функций и снижению апоптоза. Максимальный эффект снижения экспрессии Rac-1 наблюдался через 15 мин действия 10 мкМ CoQ₁₀H₂ (приблизительно в 31,5 раза относительно контроля). А максимально длительным (120 минут) и сильным эффект снижения экспрессии Rac-1 был при действии 1 мкМ CoQ₁₀ (приблизительно в 22 раза по сравнению с контролем). В работе, описывающей действие CoQ₁₀H₂ на ооциты млекопитающих в модели постовуляторного старения *in vitro*, наличие

максимально выраженного эффекта предотвращения окислительного стресса было достигнуто при концентрации 100 мкМ (Niu Y. J.; Aging (Albany NY). 2020; 12; P. 1256). Результаты экспрессии Rac-1 после действия CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂, полученные вне модели ГЭБ, значительно отличались от полученных при построении трехклеточной модели. Это подтверждает, что в трехклеточной модели, включающей помимо эндотелиальных клеток нейроны и астроциты, за счет выстроившихся межклеточных связей образовалась структура приближенная к строению ГЭБ, способная проявлять барьерные функции.

GSK-3 β является серин/треониновой протеинкиназой, которая участвует в регуляции метаболизма гликогена (Rayasam G. V.; British Journal of Pharmacology. 2009; 156(6); P. 885–898), регулирует пролиферацию, дифференцировку, внутриклеточный транспорт и клеточную гибель. В экспериментах *in vitro* на трехмерной модели контузии, состоящей из корковых нейронов мышей, выращенных на шелковом каркасе, встроенном в коллаген, наблюдалось снижение GSK-3 β в нейронах при действии CoQ₁₀ (Liudanskaya V.; Adv Healthc Mater. 2020; e2000122). Увеличение экспрессии GSK-3 β в диссертационном исследовании может быть обусловлено тем, что эксперимент проводился на клетках без патологической модели.

ZO-1-белок является белком плотных адгезионных контактов (Li X. F.; Exp Neurol. 2018; 302; P. 68–74). Группа периферически связанных каркасных белков, к которой принадлежит ZO-1, способны организовывать трансмембранные белки и связывать их с другими цитоплазматическими белками и актиновым микрофиламентом. (Förster S.; Histochem Cell Biol. 2008; 130(1); P. 55–70, Krause G.; Biochimica Et Biophysica Acta. 2008; 1778(3); P. 631–645). В некоторых исследованиях также показано, что за счет регуляции ZO-1 можно добиться защиты клеток от окислительного стресса (Li J.; Biochem Biophys Res Commun. 2019; 16, 511 (4); P. 903–909). Нарушение экспрессии ZO-1 является маркером нарушений проницаемости ГЭБ. В частности, было показано, что на белки плотных контактов ZO-1 отрицательно влияет присутствие провоспалительных цитокинов (Katusic Z. S.; Eur. Heart J. 2014; 35(14); P. 888–894, Mohammadi M. T.; Pathophysiology. 2012; 19(1); P. 13–20).

В настоящем диссертационном исследовании наблюдалось повышение экспрессии GSK-3 β и ZO-1 в экспериментальных группах по отношению к значениям в группах К. Самых высоких значений экспрессия достигала при более длительном действии (концентрации 1, 5 и 10 мкМ в течение 480 мин) и при действии в более высоких концентрациях (5 мкМ в течении 120 мин и 10 мкМ в течении 15 мин). При этом и растворитель показал влияние на экспрессию GSK-3 β и ZO-1, практически во всех группах повлияв в сторону увеличения ее значения. Результаты повышения экспрессии GSK-3 β и

ZO-1 в модели ГЭБ не позволяют сделать заключения о влиянии CoQ₁₀H₂ на участие GSK-3 β во внутриклеточных процессах и на функции белка плотных адгезионных контактов, поскольку действие растворителя также повышает экспрессию маркеров GSK-3 β и ZO-1.

Редокс-статус CoQ₁₀ в головном мозге крыс после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг. Для оценки редокс-статуса в исследование было включено 25 животных. Редокс-статус коэнзима Q₁₀ (соотношение CoQ₁₀H₂/общее содержание CoQ₁₀) измерялся в мозге и плазме. До введения препарата значение в мозге составляло 66 \pm 7,6 %, а через 2; 24; 96 и 192 ч после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ значения редокс-статуса были равны 69 \pm 6,7; 68 \pm 2,7; 69 \pm 4,7 и 66 \pm 5,1 %, соответственно. По результатам редокс-статус в мозге крыс поддерживался относительно неизменным на протяжении всего периода наблюдения: до введения, на фоне повышенных тканевых уровней (96 часов) и после возвращения к исходным (к концу 8 суток). Эти значения также измерялись в плазме и отличались между собой. В плазме крови после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ через 0,25; 2; 8; 24; 48; 96 и 192 ч составили 93 \pm 1,6; 93 \pm 3,9; 93 \pm 3,9; 91 \pm 2,6; 89 \pm 2,6; 51 \pm 12 и 32 \pm 6,2 %, соответственно.

Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки CD31, Pgr, CLDN5 и GSK-3 β в срезах разных участков мозга крыс после его однократного внутривенного введения в дозе 30 мг/кг. Экспрессия маркера CD31 (Рис. 3) в энторинальной коре срезов головного мозга крыс статистически значимо относительно группы контроля (0) с 19,11% повышалась через 2 и 24 ч после введения CoQ₁₀H₂ до 24,82% и 26%, соответственно. Также эти группы статистически значимо отличались от точки через 96 ч (17,83%). В гиппокампе количество CD31-иммунопозитивных (CD31+) статистически значимых отличий ни в одной из групп не имело. В миндалине головного мозга крыс после 2 ч действия CoQ₁₀H₂ значение экспрессии CD31 поднялось до 26,75% относительно контроля (18,39%). Между экспериментальными группами 2 ч и 192 ч (18,27) также наблюдалось статистически значимое отличие.

Количество Pgr-иммунопозитивных (Pgr+) клеток (Рис. 3) в энторинальной коре срезов головного мозга ни в одной из экспериментальных групп статистически значимо не отличалось от контроля. Статистически значимо между собой различались экспериментальные группы в точках 2 ч (27,21%) и 96 ч (40,14%). В гиппокампе экспрессия Pgr статистически значимо относительно контроля с 20,95% повышалась через 96 ч действия CoQ₁₀H₂ до 34,05%. В миндалине головного мозга крыс через 192 ч после введения препарата значение экспрессии Pgr статистически значимо относительно контроля снизилось с 29,58% до 20,96%. Между экспериментальными группами 24 ч (32,82%) и 192 ч также было статистически значимое отличие.

Экспрессия маркера CLDN5 (Рис. 3) статистически значимо относительно контроля увеличилась через 96 и 192 ч после введения CoQ₁₀H₂ в энторинальной коре срезов головного мозга с 22,33% до 34,52% и 34,85%, соответственно. В гиппокампе экспрессия CLDN5 через 192 ч статистически достоверно относительно контроля снизилась с 26,52% до 14,55%. Между экспериментальными группами 96 ч (32,37%) и 192 ч наблюдалось статистически значимое отличие. В миндалине экспрессия CLDN5 после 192 ч действия CoQ₁₀H₂ снизилась до 14,23% статистически достоверно относительно контроля, где составляло 25,06%. Также между экспериментальными группами 24 ч (31,59%) и 192 ч наблюдалось статистически значимое отличие.

Результаты анализа экспрессии маркера GSK-3β (Рис. 3) не показали статистически значимых отличий в энторинальной коре, гиппокампе, миндалине срезов головного мозга ни в одной из групп после введения CoQ₁₀H₂ ни по отношению к контролю, ни между экспериментальными группами.

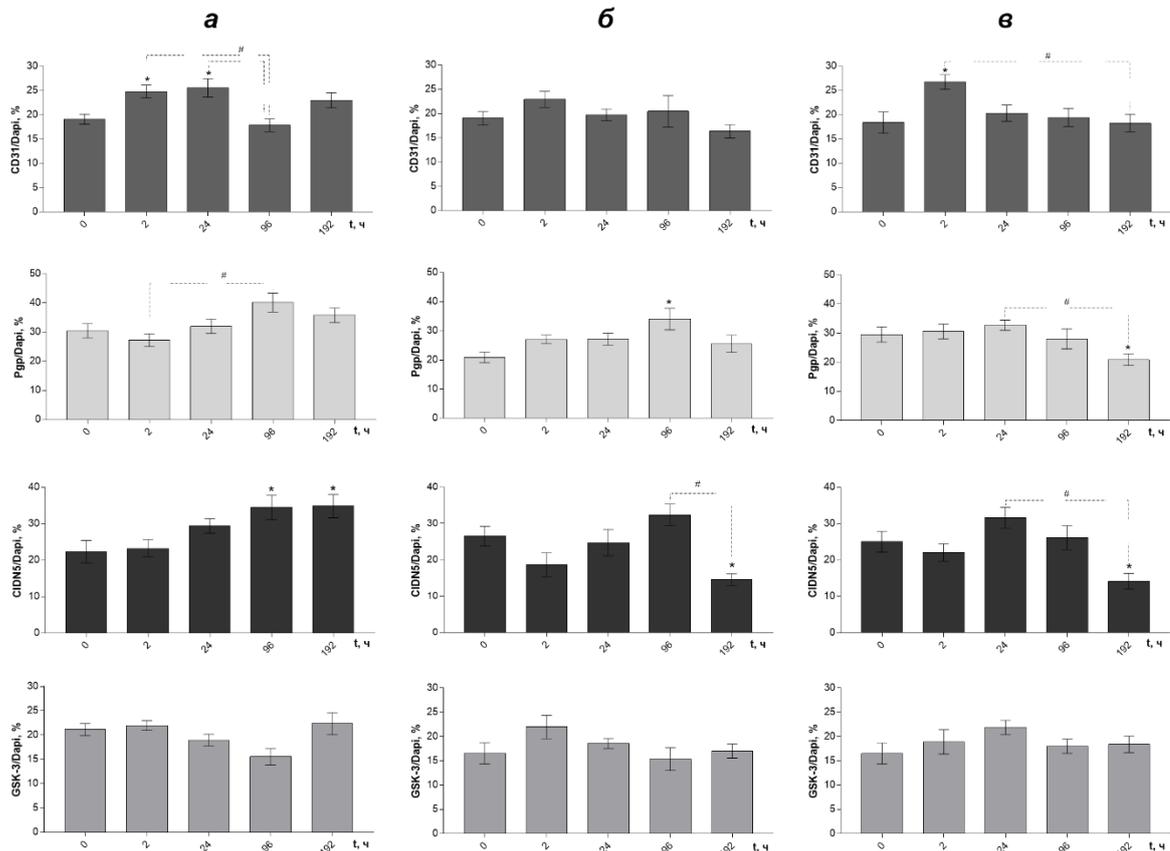


Рис. 3. Влияние однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ на количество клеток, несущих антиген (% клеток соответствующего антигена) CD31, Pgp, CLDN5, GSK-3β в структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в).

* – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия

между группами; $p \leq 0.05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Апоптоз в ткани головного мозга крыс после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (TUNEL-анализ). По результатам TUNEL-анализа, позволяющему оценить апоптоз в клетках головного мозга (Рис. 4), выявлено, что в энторинальной коре через 96 и 192 ч после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ наблюдалось снижение апоптоза с контрольной точки (0) 4,65% до 2,38% и 2,39%, соответственно. В гиппокампе наблюдалось статистически достоверное снижение апоптоза относительно контрольной группы, равной 5,15%, через 2, 24, 96 и 192 ч действия $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ до 2,6%, 2,34%, 1,76% и 1,65%, соответственно. В миндалине головного мозга крыс через 192 ч после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ значение апоптоза относительно контроля, составлявшего 3,32%, снизилось до 1,76%. Между экспериментальными группами 24 ч (3,62%) и 192 ч также наблюдалось статистически значимое отличие значений апоптоза.

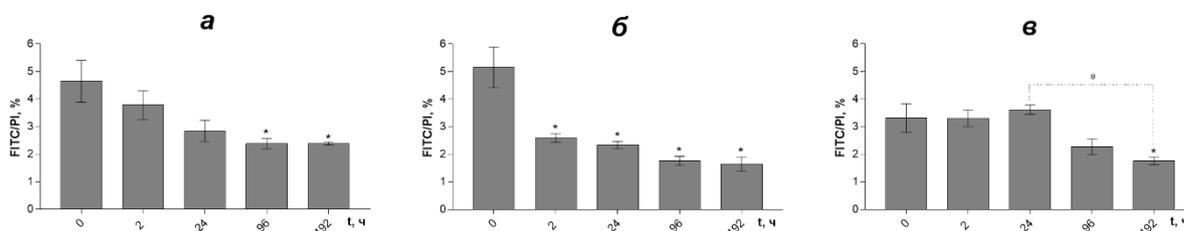


Рис. 4. Влияние $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на уровень апоптоза (% клеток соответствующего антигена FITC) в различных структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в). * – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия между группами; $p \leq 0.05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Таким образом, по результатам исследования в части экспериментов *in vivo* получено, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ способен при внутривенном введении быстро и эффективно повышать антиоксидантный резерв тканей и оказывать влияние на эндотелиальные компоненты маркеров в срезах головного мозга крыс (Таблица 4).

Значения редокс-статуса CoQ_{10} в тканях крысы до введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ отличаются от литературных данных (Zhang Y.; J Nutr. 1996; 126(9); P. 2089–2097, Takahashi T.; Lipids. 1993; 28(9); P. 803–809, Aberg F.; Arch Biochem Biophys. 1992; 295(2); P. 230–234). По полученным данным, доля восстановленного CoQ_{10} в головном мозге значительно выше, что может быть обусловлено использованным режимом анализа «on-line». В исследовании Tatsuta (Tatsuta Y.; Scientific Reports. 2017; 7(12990); P. 1-7) образцы мозга мышей также не замораживали перед анализом, и редокс-статус CoQ_{10} (60%) практически совпал с полученным результатом ($66 \pm 7,6\%$). Различия редокс-статуса CoQ_{10} в плазме и мозге свидетельствуют об окислении $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в процессе поступления из крови в ткани органов

до уровня эндогенного редокс-баланса вследствие включения препарата в локальные окислительно-восстановительные процессы.

Таблица 4. Влияние CoQ₁₀H₂ при внутривенном введении в дозе 30 мг/кг на церебральные эндотелиальные компоненты в головном мозге крыс

	Энторинальная кора	Гиппокамп	Миндалина
CD31+-клетки	↑	–	↑
Pgp+-клетки	–	↑	↓
CLDN5+-клетки	↑	↓	↓
GSK-3β+-клетки	–	–	–
Апоптоз	↓	↓	↓

Поскольку CD31 рассматривается как прогностический маркер ангиогенеза (Buckley C. D.; J. Cell Sci. 1996; 109; P. 437), действие CoQ₁₀H₂ в течение 24 ч в энторинальной коре и 2 ч в миндалине свидетельствует об активации процессов неоангиогенеза, ассоциированных с барьерогенезом. И поскольку CLDN5 относится к маркерам проницаемости эндотелиальных клеток (Nitta T.; J. Cell Biol. 2003; 161; P. 653), показано, что в энторинальной коре через 96 ч CoQ₁₀H₂ запускает процессы неоангиогенеза, ассоциированные с барьерогенезом и продолжаются до 192 ч, но при этом в гиппокампе и миндалине головного мозга спустя 192 ч после введения CoQ₁₀H₂ можно прогнозировать снижение структурной целостности ГЭБ.

Pgp является мембранным эффлюксным АТФ-зависимым белком-транспортером с широким спектром эндогенных и экзогенных субстратов: от небольших молекул, таких, как органические катионы, углеводы, аминокислоты и некоторые антибиотики до макромолекул, таких как полисахариды и белки (Zhou S. F.; Xenobiotica. 2008; 38; P. 802, Martins E.; Molecules. 2019; 24; P. 707). Он выводит из клеток ксенобиотики и эндогенные метаболиты (Sharom F. J.; Pharmacogenomics. 2008; 9; P. 105). Как известно, низкая биодоступность CoQ₁₀H₂ частично связана с его взаимодействием с Pgp, участвующим в выведении препарата (Hirano T.; J. Agric. Food Chem. 2008; 56; P. 6923, Davis B. M.; Mitochondrion. 2017; 36; P. 114) и увеличение экспрессии Pgp в гиппокампе через 96 ч говорит о том, что изменение экспрессии маркера имеет индуцибельный характер. Тот факт, что увеличение экспрессии Pgp после введения CoQ₁₀H₂ было характерным только для гиппокампа, позволяет предположить, что этот участок головного мозга ГЭБ наиболее задействован при выведении токсичных соединений из ткани мозга в кровь, что косвенно подтверждается более выраженным, по сравнению с другими отделами мозга уровнем снижения интенсивности апоптоза в гиппокампе.

GSK-3 β участвует в регуляции метаболизма гликогена, регулирует пролиферацию, дифференцировку, внутриклеточный транспорт и клеточную гибель (Rayasam G. V.; *British Journal of Pharmacology*. 2009; 156(6); P. 885–898). Исследования на моделях крыс, подвергшихся церебральной ишемии/реперфузии показали, что применение CoQ₁₀ до возникновения ишемического поражения способствует снижению экспрессии GSK-3 β в гиппокампе (Tian S.; *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2013; 29(7); P. 698–701). Результаты исследования на модели черепно-мозговой травмы *in vivo* на мышах демонстрировали, что действие CoQ₁₀ снижает GSK-3 β в нейронах (Liaudanskaya V.; *Adv Healthc Mater*. 2020; e2000122). В настоящем исследовании отличий в экспрессии GSK-3 β между контрольными группами и экспериментальными не наблюдалось ни в одной структуре головного мозга крыс. Что может быть связано с отсутствием патологических изменений в сосудах головного мозга.

Полученные данные о снижении интенсивности апоптоза при действии CoQ₁₀H₂ в норме не позволяют сказать о том, какой вклад в этот эффект вносят церебральные эндотелиоциты. Известно, что к патологиям, связанным с замедлением апоптоза, относятся опухолевые заболевания, аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, бронхиальная астма и шизофрения, а заболеваниями, опосредованными ускорением апоптоза, являются СПИД, болезни Альцгеймера и Паркинсона, анемия, инфаркты и инсульты, некоторые заболевания печени и почек, лучевая болезнь (Сибиряк С.; *Медицинский вестник Башкортостана*. 2006; 1(1); С. 127–133). Проведено множество исследований, где снижение апоптоза продемонстрировано действием коэнзима Q₁₀ при различных моделях патологий. По результатам исследования, в котором на мышах оценили действие убихинола при митохондриальной дисфункции, вызванной диабетической нефропатией, было установлено, что препарат снижает уровень апоптоза, тем самым оказывая влияние на диабетическую нефропатию через митофагию, восстанавливая передачу сигналов Nrf2/ARE (Sun J.; *Endocrinol*. 2019; JOE-18-0578.R1). Также эффект снижения апоптоза продемонстрирован действием коэнзима Q₁₀ против окислительного стресса, индуцированного гипергликемией в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES), путем ингибирования митохондриально-зависимого пути через каспазу-3 (Tsuneki H.; *Eur. J. Pharmacol*. 2007; 566; P. 1, Tsai H. Y.; *J. Diabetes Res*. 2016; 6384759) и против вызванного пероксидом водорода, при котором убихинол заметно снижал количество β -галактозидаза-позитивных клеток, связанных со старением, и подавлял экспрессию ассоциированных со старением секреторных фенотип-ассоциированных генов в клетках HUVES, предотвращая образование внутриклеточных АФК (Huo J.; *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; P. 1–15).

ВЫВОДЫ

1. CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ повышает проницаемость ГЭБ в течение периода 2-8 ч. При этом CoQ₁₀H₂ в концентрации 10 мкМ способен снижать проницаемость ГЭБ через 15 мин действия.
2. CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ модулируют экспрессию Rac-1 в модели ГЭБ, снижая ее в течение 2 ч и тем самым снижая АФК-индуцированную проницаемость ГЭБ.
3. Редокс-статус CoQ₁₀ после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг в мозге оставался на одном уровне. Различия редокс-статуса в мозге и плазме крови свидетельствуют о частичном окислении CoQ₁₀H₂ при поступлении из крови в мозг до уровня их эндогенного тканевого редокс-баланса. Это подтверждает включение препарата в локальные окислительно-восстановительные процессы и доказывает возможность быстрого и эффективного повышения антиоксидантного резерва мозга при внутривенном введении CoQ₁₀H₂.
4. CoQ₁₀H₂ повышает количество CD31⁺-клеток в миндалине и энторинальной коре, увеличивает количество Pgp⁺-клеток с маркером в гиппокампе и снижает в миндалине, а также повышает количество CLDN5⁺-клеток в энторинальной коре, но снижает в гиппокампе и миндалине и не влияет на GSK-3β. Увеличение количества CD31⁺-клеток в коре, наблюдающееся через 2-24 ч действия CoQ₁₀H₂, сопровождалось последующим увеличением количества CLDN5⁺-клеток в период 96-192 ч, что говорит о признаках интенсификации ангиогенеза. При этом в миндалине увеличение CD31⁺-клеток сопровождалось отсроченным снижением CLDN5⁺-клеток, а в гиппокампе было лишь снижение CLDN5⁺-клеток, что подтверждает регион-специфическое действие CoQ₁₀H₂.
5. CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг снижает апоптоз в коре, гиппокампе и миндалине. Стремительное снижение наблюдается в гиппокампе через 2 ч и длится до 8 суток во всех вышеописанных структурах головного мозга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные данные о действии 1% водного раствора солюбилизированной субстанции CoQ₁₀H₂ для внутривенного введения на проницаемость и эндотелиальные компоненты ГЭБ следует учитывать при дальнейших доклинических и клинических исследованиях препарата для профилактики и терапии нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – Аденозинтрифосфат	DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)
АФК – Активная форма кислорода	FITC – Fluorescein isothiocyanate (флюоресцеинизотиоционат)
ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография	GSK-3 β – Glycogen Synthase Kinase 3 beta (Киназа гликогенсинтазы-3)
ГЭБ – Гематоэнцефалический барьер	Pgp – P-Glycoprotein
К – Контроль	PI – Пропидий йодид
НАДН – Восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида	Rac-1 – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Р – Растворитель (плацебо раствор)	SD – Standard Deviation (стандартное отклонение)
ТЭС – Трансэндотелиальное) электрическое сопротивление	TUNEL – TdT dUTP Nick End Labeling
CD31 (PECAM-1) – Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (молекула адгезии тромбоцитов / эндотелиальных клеток 1)	ZO-1 – Zonula occludens (белки плотных контактов)
CoQ ₁₀ – Коэнзим Q ₁₀ , убихинон	
CoQ ₁₀ H ₂ – Убихинол	

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах индексируемых Scopus, RSCI, Web of Science, из перечня ВАК:

1. Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Оболенская О.Н., **Шаповал Н.С.**, Макаров В.Г., Медведев О.С. Фармакокинетика и тканевое распределение коэнзима Q₁₀ у при внутривенном введении в окисленной и восстановленной формах. Химико-фармацевтический журнал. 2021. V. 55, № 7, P. 3-7.
2. **Шаповал Н.С.**, Малиновская Н.А., Моргун А.В., Салмина А.Б., Оболенская О.Н., Медведева Н.А., Медведев О.С. Влияние убихинола на состояние церебральных эндотелиоцитов в различных структурах головного мозга крыс. Цитология. 2020. V. 62, № 12, P. 894-902.
3. **Шаповал Н.С.**, Медведев О.С., Медведева Н.А., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Осипова Е.Д., Салмина А.Б. Влияние окисленной и восстановленной форм коэнзима Q₁₀ (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эндотелия в модели гематоэнцефалического барьера. Цитология. 2020. V. 62, № 6, P. 428-437.
4. **Шаповал Н.С.**, Медведев О.С., Моргун А.В., Антонова С.К., Салмина А.Б. Митохондрии клеток церебрального эндотелия как потенциальная мишень для нейропротекторного действия коэнзима Q₁₀. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020. V. 83, № 3, P. 40-46.
5. Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Оболенская О.Н., **Шаповал Н.С.**, Макаров В.Г., Медведев О.С. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима Q₁₀ у крыс после внутривенного введения убихинола. Химико-фармацевтический журнал. 2018. V. 52, № 6, P. 149-152.

Тезисы:

1. **Shapoval N.**, Obolenskaia O., Kalenikova E., Gorodetskaya E., Medvedev O. Tissue distribution and redox status of coenzyme Q₁₀ after intravenous administration of ubiquinol to rat. Journal of Hypertension. 2018. V. 36, P. 149-150.
2. Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Оболенская О.Н., **Шаповал Н.С.**, Медведев О.С. Фармакокинетика и тканевое распределение убихинола при внутривенном введении. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. V.81. P. 103–104.