

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

ШАПОВАЛ НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОЭНЗИМА Q10 НА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ
КОМПОНЕНТЫ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Доктор медицинских наук, профессор
Медведев Олег Стефанович
Доктор медицинских наук, профессор
Салмина Алла Борисовна

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
Характеристика клеток эндотелия. Особенности клеток церебрального эндотелия	10
Митохондрии и их роль в метаболизме церебральных эндотелиоцитов	17
Коэнзим Q ₁₀ и его роль в метаболизме клетки	20
Потенциальная мишень нейропротекторного действия экзогенного коэнзима Q ₁₀ – митохондрии эндотелиоцитов головного мозга	23
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
Объект и методы исследования.....	29
Исследуемые препараты	29
ЭКСПЕРИМЕНТЫ <i>IN VITRO</i>	30
ЭКСПЕРИМЕНТЫ <i>IN VIVO</i>	36
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	42
Оценка влияния CoQ ₁₀ и CoQ ₁₀ H ₂ на проницаемость ГЭБ в условиях <i>in vitro</i>	42
Экспрессия белка Rac-1	46
<i>Оценка экспрессии белка Rac-1 на трехклеточной модели ГЭБ in vitro</i> ..	46
<i>Оценка экспрессии белка Rac-1 на монослое клеток эндотелия in vitro</i> ..	52
Оценка экспрессии GSK-3β на трехклеточной модели ГЭБ <i>in vitro</i>	59
Оценка экспрессии ZO-1 на трехклеточной модели ГЭБ <i>in vitro</i>	64
Редокс-статус CoQ ₁₀ в головном мозге крыс после однократного внутривенного введения CoQ ₁₀ H ₂ в дозе 30 мг/кг	69

Иммуногистохимический анализ срезов мозга крыс после однократного внутривенного введения Убихинола в дозе 30 мг/кг	72
<i>Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки CD31 в срезах разных участков мозга крыс</i>	<i>72</i>
<i>Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки Pgr в срезах разных участков мозга крыс</i>	<i>74</i>
<i>Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки CLDN5 в срезах разных участков мозга крыс</i>	<i>77</i>
<i>Влияние CoQ₁₀H₂ на экспрессию GSK-3β в срезах разных участков мозга крыс.....</i>	<i>79</i>
Апоптоз в ткани головного мозга крыс после однократного внутривенного введения CoQ ₁₀ H ₂ (TUNEL-анализ)	82
ГЛАВА IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	92
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96
БЛАГОДАРНОСТИ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

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 [21, 100]. В настоящее время показано, что нарушение нормального функционирования клеток церебрального эндотелия, в том числе, нарушение функций митохондрий в клетках [37] способно приводить к развитию нейровоспаления и нейродегенеративных заболеваний, в частности, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона [8].

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 [74, 95, 119]. Препараты коэнзима Q₁₀ за счет проявления нейропротекторного действия перспективны в лечении и профилактике ряда заболеваний, вызванных митохондриальными нарушениями [85, 115, 125]. Известно, что коэнзим Q₁₀ способен проникать через ГЭБ [60], 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 [141], 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 солубилизированной субстанции убихинола) в дозе 10 мг/кг [1, 9]. 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 солубилизированных 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 CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг.
5. Оценить апоптоз в клетках церебрального эндотелия на срезах головного мозга крыс после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг.

Научная новизна исследования. Впервые экспериментально показана вовлеченность коэнзима Q₁₀ в процессы регуляции проницаемости ГЭБ. Показано повышение проницаемости ГЭБ при действии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ и снижение проницаемости ГЭБ при действии CoQ₁₀H₂ в концентрации 10 мкМ на клетки модели ГЭБ *in vitro*.

Впервые показана способность CoQ₁₀H₂ 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 сердечнососудистых 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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Характеристика клеток эндотелия. Особенности клеток церебрального эндотелия

Эндотелиальные клетки выстилают кровеносные сосуды, контролируют и регулируют всю систему кровообращения (тонус сосудов, метаболизм и миграцию клеток, синтез про- и противовоспалительных цитокинов) [30]. Поскольку эти клетки выступают в качестве барьера между просветом сосуда и окружающими тканями, их важной ролью является фильтрационная функция. Помимо этого, они реагируют на изменения скорости кровотока, гуморальные факторы регуляции тонуса сосудов, процессы воспаления, ангиогенез и васкулогенез [10, 26].

На сегодняшний день установлено, что нарушение нормального функционирования эндотелиоцитов является одним из факторов множества сердечно-сосудистых патологий разного генеза: гипертонической болезни, атеросклероза [46], сердечной недостаточности, острого коронарного синдрома, микроальбуминурии, тромбозов, внутрисосудистой коагуляции, преэклампсии, сахарного диабета I и II типов [94], ревматоидного артрита [137], васкулита, вазоспазма, мигрени, нейродегенеративных заболеваний, глаукомы, диабетической ретинопатии [4, 26, 139]. В этой связи особенно актуальными стали исследования функций эндотелиальных клеток *in vivo*, а также с использованием культур *in vitro*, включая модели гистогематических барьеров, таких как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [13, 17, 18, 26, 48]. Эти исследования значительно расширили представления о механизмах участия клеток эндотелия в регуляции ключевых процессов в сердечно-сосудистой системе, о специфических особенностях эндотелия в различных тканях. Таким образом установлено, что церебральный эндотелий имеет существенные отличия от эндотелиоцитов сосудов других органов [11].

Центральная нервная система (ЦНС) отделена от циркулирующей крови и других систем организма эндотелиоцитами, которые выстилают сосуды головного мозга, образуя полупроницаемый барьер – ГЭБ. Особый интерес в аспекте ГЭБ представляют клетки церебральных микрососудов, участвующих в многообразных транспортных процессах в составе так называемой нейроваскулярной единицы головного мозга, включающей, помимо эндотелиоцитов, перициты, периваскулярные астроциты, нейроны и, по мнению некоторых авторов, микроглию [8, 21, 51, 52] (Рис.1).

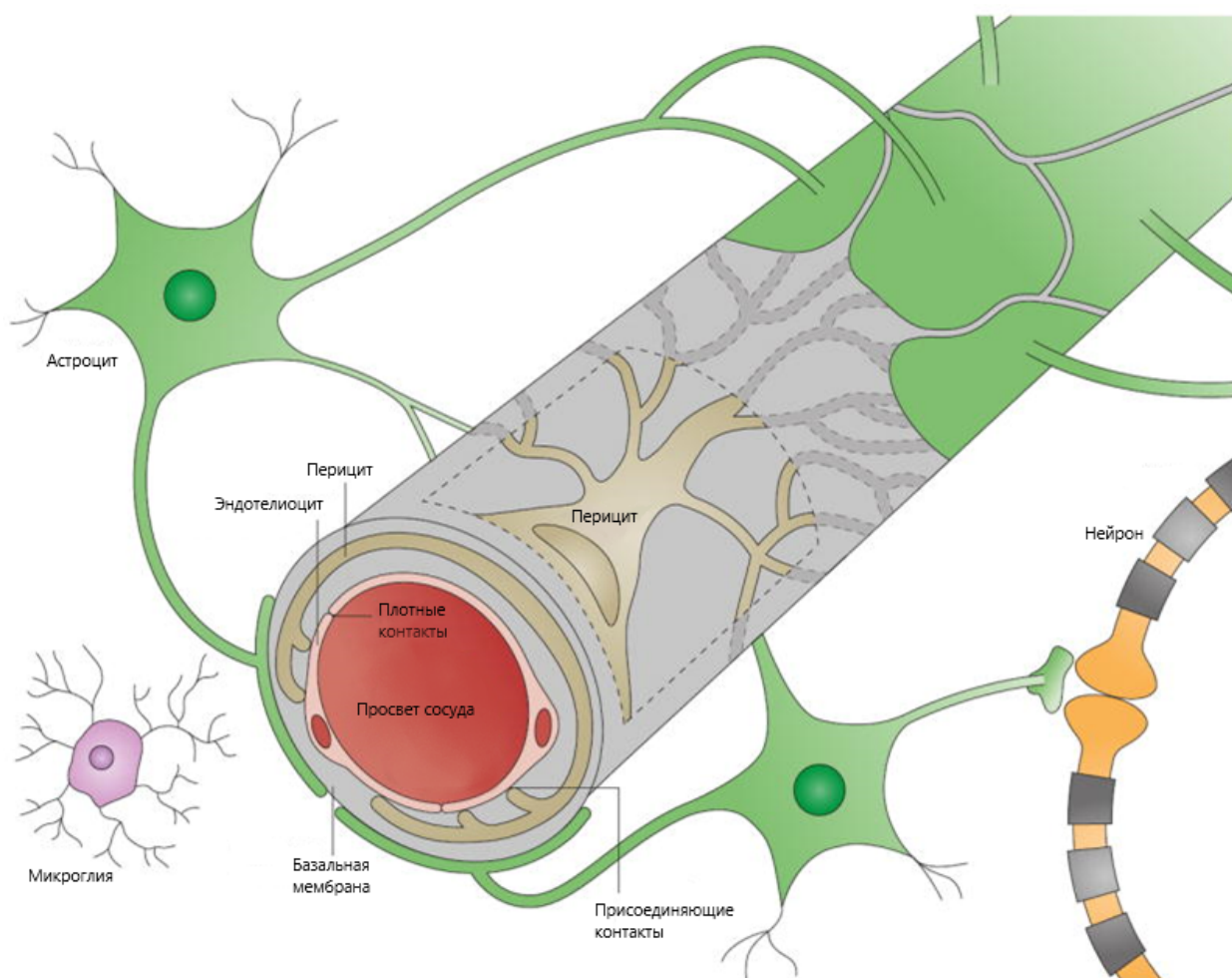


Рис. 1. Связь клеток гематоэнцефалического барьера. Адаптировано из [100].

Когда ГЭБ был впервые обнаружен, считалось, что в его формировании принимают участие только клетки эндотелия [40, 41]. После чего в 1967 году с помощью электронной микроскопии впервые было показано, что эндотелиальные клетки сосудов головного мозга отличаются от эндотелиоцитов сосудов других органов и наглядно продемонстрировано, что прохождению веществ в ЦНС препятствуют плотные контакты [27, 109, 134].

Несомненно, эндотелий является основной составляющей ГЭБ и представляет собой слой клеток, выстилающих кровеносные сосуды [65], который располагается на базальной мембране, принимающей участие в регуляции трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта. За счет структурно-функциональных особенностей ГЭБ, нейроваскулярная единица головного мозга представляет собой высоко динамичную систему, в полной мере реализующую механизмы защиты головного мозга от токсинов и метаболитов, нейроваскулярного регулирования, обеспечивающего необходимое кровоснабжение активных участков головного мозга, селективного транспорта метаболитов и нейромедиаторов из ткани мозга в кровь, а также механизмы нейропластичности [10, 51, 52, 135]. На сегодняшний день аберрантная активность клеток нейроваскулярной единицы и ГЭБ рассматривается как важное звено патогенеза многих заболеваний ЦНС (нейродегенерация, нарушения развития головного мозга, травма, нейроинфекция и другие).

Такие свойства по большей части обусловлены активностью микрососудистых клеток церебрального эндотелия, отличающихся от эндотелиальных клеток других органов наличием плотных, щелевых и адгезивных контактов, отсутствием капиллярных фенестраций, высоким трансэндотелиальным электрическим сопротивлением (ТЭС), низкой пиноцитозной активностью и высокой степенью плотности митохондрий [2, 44, 71, 114]. Все приведенные особенности церебрального эндотелия во

многим определяются экспрессией комплексов белков, необходимых для осуществления избирательной проницаемости ГЭБ по отношению к широкому спектру веществ и различных соединений.

Плотные контакты между церебральными эндотелиоцитами составляют структурную основу барьера, позволяющую реализовывать низкую проницаемость [39, 52]. На данный момент известно о не менее, чем 40 белках, участвующих в формировании плотных контактов. Таким образом, плотные контакты представляют собой сложный комплекс трансмембранных и цитоплазматических белков, объединенных с актином цитоскелета. Некоторые белки участвуют в возникновении контакта между близлежащими клетками, к примеру, такие, как клаудин, наиболее распространенным из которых является клаудин-5 (CLDN5) [24], окклюдин и белок JAM. Другие выступают связующим звеном с актинсодержащим цитоскелетом и некоторыми органеллами, в том числе митохондриями. К таким белкам относят, например, ZO-белки [32]. Поскольку плотные контакты способствуют ограничению парацеллюлярного транспорта гидрофильных молекул в мозг [52], это позволяет реализовать важную функцию поддержания химического гомеостаза в ткани ЦНС [65].

Формирование *адгезивных контактов* осуществляется кадгеринами и нектинами, представляющими собой семейства трансмембранных белков, связывающих адгезивные рецепторы. Внеклеточная часть этих белков способствует адгезии близлежащих клеток между собой, а внутриклеточные части обеспечивают контроль формирования и функционирования адгезивных контактов и регулируют связь с актиновым цитоскелетом путем взаимодействия с цитоплазматическими белками, такими как катенины и афадин [34].

В роли молекулы адгезии сосудистого эндотелия рассматривается CD31, которая локализуется в некоторых ключевых типах клеток, связанных

с сосудистым компартментом. В связи с этим CD31 реализует многочисленные и значимые межклеточные взаимодействия при участии тромбоцитов, лейкоцитов и эндотеоцитов в рамках процессов формирования, функционирования и регенерации сосудов, а также в развитии дисфункций эндотелия на самых ранних этапах. В результате CD31 может рассматриваться в качестве потенциальной мишени для новых терапевтических веществ, направленных на устранение или предупреждение различных патологических состояний [35, 120].

В суперсемейство *кадгеринов* входит более 20 белков. К характерной особенности эндотелиальных клеток относится экспрессия эпителиального кадгерина (Е-кадгерин), включающего пять иммуноглобулиноподобных внеклеточных доменов, осуществляющих адгезию между близлежащими клетками [49]. При этом первоначально происходит формирование цис-димеров кадгеринов на клетке. Далее возникает взаимодействие с прилегающей клеткой с последующим формированием транс-димеров (транс-кадгерин). Димеры транс- и цис-кадгерина способствуют реализации прочной адгезии, не допуская разъединение клеток. N-концевые домены и цитоплазматическая составляющая Е-кадгерина высоко консервативны, что способствует взаимодействию с белками катенина и другими актин-связывающими цитоскелет белками [58]. В свою очередь к катенинам, с которыми взаимодействует цитоплазматический домен кадгерина, относятся β -, α - и p120-катенин. Причем β -катенин соединяется с α -катенином, который в последствии связывает Е-кадгерин с актиновым цитоскелетом. По сути, α -катенин является актин-связывающим белком. Что касается p120-катенина, он непосредственно связывается с юкстамембранным доменом Е-кадгерина, что позволяет Е-кадгерину стабилизироваться на цитоплазматической мембране, после чего способствует кластеризации кадгерина и активирует ГТФазы Rho-семейства, которые связывают эффекторные белки и модулируют динамику актина [59]. Немаловажно отметить, что β -катенины

необходимы для запуска механизмов сигнального пути Wnt в клетках эндотелия, что в конечном итоге определяет эффективность механизмов ангиогенеза и барьерогенеза [55]. К тому же в некоторых типах клеток E-кадгеринины выполняют функцию «настройки» метаболизма клеток (баланс гликолиз/митохондриальное дыхание) при изменении пролиферативного клеточного статуса [104], что, судя по всему, может быть значимым в регуляции процессов нейрогенеза и церебрального ангиогенеза.

Семейство нектинов насчитывает 4 представителя, которые имеют различные между собой формы сплайсинга. Внеклеточный домен нектина содержит три Ig-подобные петли, необходимые для димеризации нектинов, а также трансмембранную и цитоплазматическую часть. По аналогии с кадгеринами, димеризация нектина осуществляется через процесс формирования цис-димеров с дальнейшим образованием транс-димеров через межклеточные соединения [79]. Как и кадгеринины, нектины обеспечивают адгезию в клетках и способствуют апикально-базолатеральной полярности. Тем не менее, такая адгезия существенно отличается от адгезии кадгерининов. Прежде всего, димеры нектина не могут обеспечивать прочную межклеточную связь. Также, нектины взаимодействуют с другими нектинами. Помимо этого, цитоплазматические части нектинов образуют межбелковые взаимодействия с белком афудином, связывающим нектины и кадгерин с актиновым цитоскелетом [79, 84].

Щелевые контакты образуются каналами-коннексонами, составной частью которых являются белки-коннексины (Cx) (непосредственно, церебральные эндотелиоциты экспрессируют Cx37, Cx40, Cx43), а также белками-паннексинами [66, 101]. При помощи этих каналов происходит обмен ионами и низкомолекулярными соединениями между контактирующими клетками, что способствует эффективному клеточному взаимодействию и важно для их скоординированного участия в обеспечении определенных функций [12]. В дополнение, коннексины непосредственно

взаимодействуют с окклюдинами, клаудинами и белками ZO-1 в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга [92], что, по всей видимости, является значимым для обеспечения сопряжения метаболических процессов и структурной целостности ГЭБ. Паннексины, находясь в клетках по большей части в виде «полуканалов», открывающихся во внеклеточное пространство, способствуют высвобождению глутамата, АТФ, лактата и некоторых ионов из клеток. Массивное открытие данных каналов при этом может вызвать нарушение регуляции транспорта через ГЭБ [66].

Доказано, что экспрессия АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ABC-транспортеры) в церебральных эндотелиоцитах дополнительно препятствует проникновению ксенобиотиков из кровотока в мозг [87]. Р-гликопротеин (Pgp/Abcb1) – ключевой транспортер, локализующийся на просветной стороне церебрального эндотелия [89]. Предполагается, что транспортеры в ГЭБ могут регулироваться действием различных стимулирующих процессов, в том числе окислительным стрессом, воспалительным ответом, нейродегенерацией, фосфолипидами и ксенобиотиками [86].

За счет экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов эндотелий сосудов головного мозга селективно регулирует парацеллюлярные процессы проницаемости, а его свойство обеспечивать контроль трансцеллюлярного транспорта (в частности, путем изменения активности монокарбоксилатных переносчиков, транспортеров глюкозы, Р-гликопротеина и других) позволяет ГЭБ быть оптимальной структурой для поддержания химического гомеостаза в ткани ЦНС [39].

Следует также отметить, что церебральные эндотелиоциты принимают участие в регуляции реологических свойств крови, предотвращая тромбообразование на поверхности слоя эндотелия, в контроле водного транспорта, предупреждая развитие отека мозга, в обеспечении миграции

иммунокомпетентных клеток в ткань головного мозга при развитии воспаления, а также в образовании подходящей микросреды для клеток нейрогенных ниш [39, 65, 106].

Митохондрии и их роль в метаболизме церебральных эндотелиоцитов

Другой особенностью, характерной для церебральных эндотелиоцитов, является высокое количество митохондрий, которое, как правило, в 5-6 раз выше относительно значений в эндотелиальных клетках других тканей и органов [70]. Установлено, что митохондрии, являясь довольно динамичными структурами, способны мигрировать внутри клетки из одного места в другое, создавая при этом взаимосвязанные сети с другими митохондриями или структурами клетки. Митохондрии могут реконструироваться под действием процессов репликации и деления/слияния в ответ на физиологические и патологические факторы [30]. Собственно, число митохондрий в клетках наглядно демонстрирует баланс между процессами митохондриального биогенеза и митофагии [97]. Количество митохондрий в клетках эндотелия, в сравнении с содержанием митохондрий в других типах клеток организма с повышенными энергетическими потребностями, относительно невелико. Так, к примеру, в сердечных миоцитах крыс митохондрии занимают около 32% от объема всей жидкости, тогда как в эндотелиальных клетках их 2-6%. Однако из всех локализаций эндотелиальных клеток максимальное количество митохондрий (8-11%) зарегистрировано именно в эндотелиоцитах сосудов головного мозга [70].

Помимо того, что митохондрии выполняют энергетическую функцию, им также присуще участие во множестве других биохимических процессах (в частности, митохондрии являются главным источником в клетках НАДН и первичных компонентов пиримидинового и липидного биосинтетических путей, в том числе и пути окисления жирных кислот, регулируют уровень метаболитов и аминокислот в клетке, принимают участие в синтезе гема),

кроме того участвуют в гомеостазе кальция, распределяя его, буферизируя поток кальция из плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума [31, 36, 90]. Регуляция экспрессии генов в митохондриях происходит за счет сигналов окружающей среды и эволюционировала для того, чтобы иметь возможность управлять выработкой энергии в соответствии с энергетическими потребностями клетки. Нарушение этого механизма способно приводит к развитию некоторых заболеваний [23, 45, 78, 96, 107].

Еще один важный аспект, митохондрии являются основным внутриклеточным источником и мишенью активных форм кислорода (АФК), которые в клетках человека непрерывно образуются в качестве субпродуктов аэробного метаболизма [136]. Выявлено, что с возрастом дыхательная функция митохондрий ослабевает, а нарушения работы дыхательной цепи усиливают образование АФК и свободных радикалов в митохондриях. В определенном диапазоне концентраций АФК способны вызывать стрессовые реакции в клетках посредством изменения экспрессии определенных генов, тем самым пытаюсь сберечь метаболическую энергию для спасения клетки. Тем не менее за пределами порога концентраций АФК могут индуцировать апоптоз, вызывая изменение проницаемости мембран митохондрий и высвобождение цитохрома *c*. По результатам множества исследований за последнее время было установлено, что митохондрии занимают ведущую роль в ранней фазе апоптоза [25, 116, 140].

В церебральных эндотелиальных клетках митохондрии, несомненно, выполняют все те же функции, которые присущи этим органеллам и в других клетках и тканях, при этом следует подчеркнуть ряд их отличительных характеристик. Митохондрии церебральных эндотелиоцитов обеспечивают энергией критичные для функциональной активности клеток ГЭБ процессы, особенно важные для сохранения структурной целостности барьера, а также реализации процессов ангиогенеза и барьерогенеза. Продукция АФК

митохондрий церебрального эндотелия участвует во внутриклеточной передаче сигналов, регуляции апоптоза и аутофагии. Митохондрии регулируют внутриклеточный гомеостаз кальция, содержание которого, в свою очередь, влияет на изменение форм эндотелиальных клеток (что, в частности, играет ключевую роль в регуляции парацеллюлярной проницаемости ГЭБ и проникновении в ткань головного мозга иммунокомпетентных клеток), а также митохондриальный биогенез и ремоделирование. Митохондрии церебральных эндотелиоцитов регулируют обмен основных метаболитов, обуславливающих эффективность межклеточных взаимодействий в нейроваскулярной единице головного мозга, к примеру, в поступлении и транспорте лактата [70, 113, 131].

Следует отметить, что церебральные эндотелиальные клетки могут выступать в роли реципиента митохондрий от других клеток, в частности, мезенхимальных стволовых клеток, что позволяет головному мозгу восстанавливаться после ишемического повреждения благодаря контролируемой проницаемости ГЭБ и интенсификации процессов ангиогенеза [80]. Как раз при повреждении головного мозга митохондриальная дисфункция церебральных микрососудистых эндотелиальных клеток признана важнейшим звеном патогенеза развития неврологического дефицита. Таким образом, например, определена взаимосвязь между степенью митохондриальной дисфункции церебральных эндотелиоцитов и проявлением гипотермии в постинсультном периоде [54], доказано, что митохондриальные механизмы задействованы в патогенезе нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом [110], также в экспериментах *in vitro* выявлено, что цитохром *c* в митохондриях клеток церебральных эндотелиоцитов – мишень для действия микроРНК miR-34a, которая обуславливает открытие ГЭБ [29]. И как следствие, нарушение функций митохондрий в клетках церебрального эндотелия (митохондриальный кризис) способствует критическому увеличению

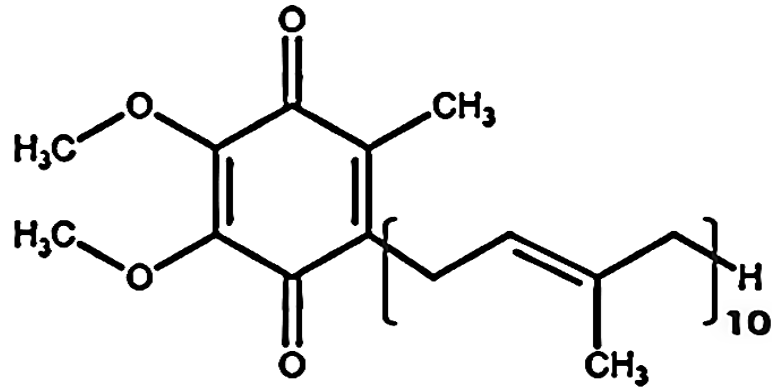
проницаемости ГЭБ [37], что можно отнести к одному из механизмов, нуждающемуся в коррекции при устранении последствий повреждения головного мозга от перенесенных заболеваний ЦНС (например, таких как нейродегенерация, острая гипоксия, ишемия, нейроинфекции и другие).

Коэнзим Q₁₀ и его роль в метаболизме клетки

За последние годы повышенное внимание привлекает к себе препарат коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀, убихинон, убидекаренон), перспективный в лечении и профилактике ряда патологий, связанных с митохондриальными нарушениями.

Встречается несколько форм коэнзима Q₁₀, которые содержатся повсеместно в живых организмах (от микроорганизмов, растений до млекопитающих, включая человека). У человека кофермент Q₁₀ преобладает в сердце, печени, почках, и поджелудочной железе. Коэнзим Q₁₀ представляет собой эндогенно синтезированный жирорастворимый провитамин [128]. Его химическая структура выглядит как 2,3 диметокси-5 метил-6 декапренил бензохинон. Кольцо хинона в CoQ₁₀ является функциональной группой, а также характерно наличие изопреноидной боковой цепи. При этом число изопреновых звеньев боковой цепи может быть различным у разных видов живых организмов. Так как коэнзим Q₁₀ может быть представлен двумя формами (Рис. 2): окисленной и восстановленной, то это может определять какие свойства он будет проявлять. Таким образом, возможен переход из одной формы в другую, путем восстановления хинона до хинола (CoQ₁₀H₂) с образованием носителя протонов и электронов [47, 74].

А.



Б.

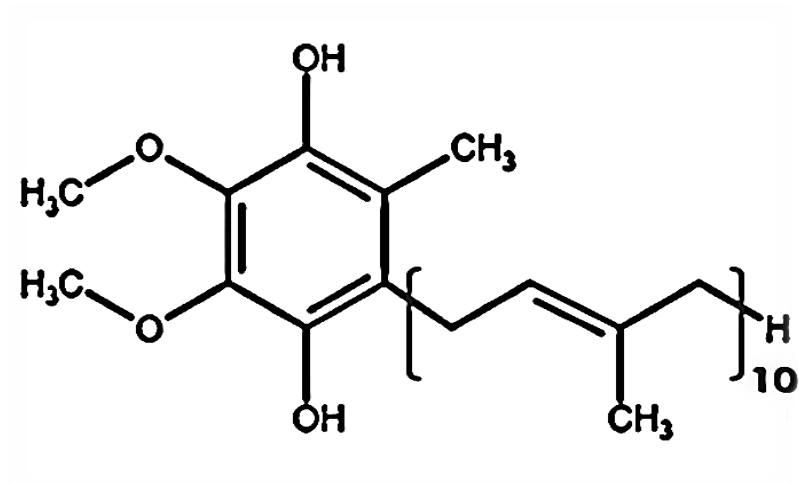


Рис. 2. А. – Окисленная форма коэнзима Q₁₀ (убихинон, CoQ₁₀); Б. – Восстановленная форма коэнзима Q₁₀ (убихинол, CoQ₁₀H₂).

Общее содержание коэнзима в организме варьирует в диапазоне от 0,5 до 1,5 г, при этом основная его часть сосредоточена в типах клетках с высокой энергетической потребностью, например, клетках сердечной мышцы [42, 47, 74]. Распределение коэнзима внутри клетки также неравномерно. Так 40-50% коэнзима Q₁₀ содержится во внутренней

мембране митохондрий, что выше по отношению к содержанию в других структурах клетки, таких как эндоплазматический ретикулум, пероксисомы, лизосомы и везикулы. Для сравнения, в ядре сосредоточено 25-30% коэнзима Q10 [47, 74]. В кровотоке в восстановленной форме циркулирует около 75% коэнзим Q10 [42].

Коэнзим Q10 выступает в роли переносчика электронов дыхательной цепи, что требуется для осуществления синтеза АТФ [74, 128]. В процессе синтеза АТФ в дыхательной цепи коэнзим служит кофактором и, принимая электроны из комплекса I и II, передает их комплексу III [47, 85, 119].

Также коэнзим Q10 принимает участие в защите липопротеинов, циркулирующих в кровотоке, от окислительного повреждения, в том числе, митохондрий и других компонентов клеток от АФК, которые могут образовываться в результате потери электронов дыхательной цепи митохондрий [125]. Антиоксидантные свойства проявляются при восстановлении CoQ10 до CoQ10H2 [128]. Коэнзим предупреждает окислительный стресс, снижая выработку свободных радикалов в митохондриях [95, 119]. С этим же связано и антиапоптотическое действие коэнзима Q10: он способен регулировать трансмембранный потенциал митохондрий, препятствовать выработке церамида и влиять на экспрессию митохондриальных белков контактов [119]. Помимо этого, коэнзим приводит к стабилизации кальций-зависимых ионных каналов, ингибирует активность внутриклеточных фосфолипаз, влияя на метаболизм простагландинов, а также может предотвращать истощение метаболитов, обеспечивающих синтез АТФ [128].

Дополнительное применение кофермента Q10 способствует существенному повышению общего количества кофермента Q10 в митохондриях [85]. При приеме коэнзима Q10 у здоровых людей снижется уровень перекисного окисления липидов, не влияя при этом на содержание

другого антиоксиданта (витамина Е). Таким образом, полагается, что коэнзим значительно эффективен в предотвращении перекисного окисления липидов, так как препятствует его возникновению и последующему распространению [85, 128].

Потенциальная мишень нейропротекторного действия экзогенного коэнзима Q₁₀ – митохондрии эндотелиоцитов головного мозга

За последнее время получено довольно большое количество экспериментальных данных, подтверждающих положительное влияние экзогенного Q₁₀ на различные заболевания головного мозга. Так, например, введение CoQ₁₀ мышам с трансгенной моделью наследственного бокового амиотрофического склероза приводит к повышению количества митохондрий в клетках головного мозга. Таким образом, коэнзим обеспечивает защиту от глутаматной токсичности в культивируемых нейронах мозжечка [85].

Как уже было показано во многих исследованиях, коэнзим Q₁₀ способен проникать через ГЭБ [60, 64, 85, 125]. В совместных исследованиях с О. Obolenskaia и соавторами было установлено, что тканевая биодоступность CoQ₁₀H₂, рассчитанная как отношение площадей (%) под кинетическими кривыми, для головного мозга составила 10,4% [5, 6, 7, 117]. Также из полученных данных тканевого содержания CoQ₁₀ в мозге крыс следует, что уже через 15 минут после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг происходит повышение его уровня в головном мозге на 80%, относительно контроля (0). Через 2 часа содержание коэнзима увеличивается приблизительно в 2 раза относительно контроля. По истечении 24 часов наблюдается снижение уровня CoQ₁₀ относительно значения, которое наблюдалось через 2 ч, но при этом остается выше относительно контроля на 47%, на таком высоком уровне значение сохраняется в течение 4 суток после введения препарата. Снижение содержания CoQ₁₀ примерно на 11,4%

относительно контроля, зафиксировано через 8 суток после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ [5, 117].

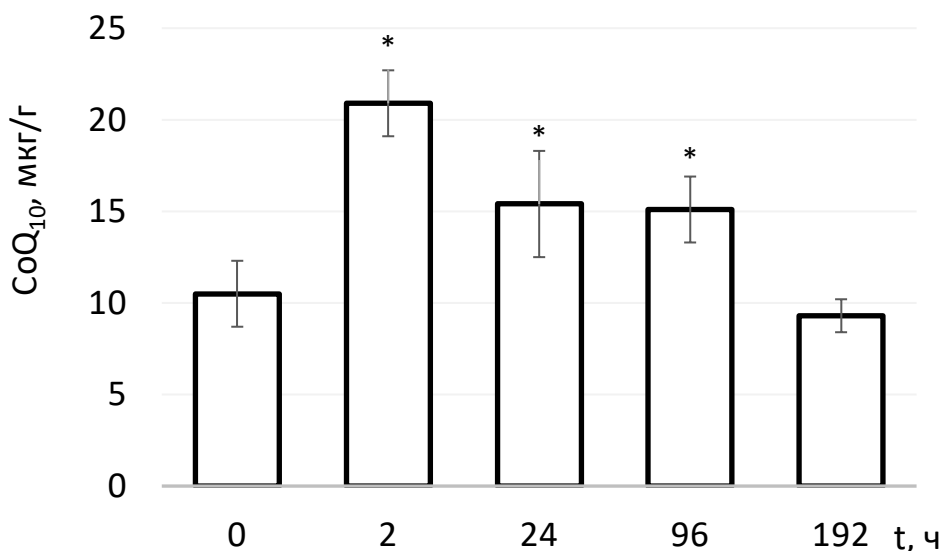


Рис. 3. Тканевое содержание CoQ_{10} в мозге крыс после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 30 мг/кг. Адаптировано из [5].

Таким образом показано, что CoQ_{10} проникает через ГЭБ довольно быстро, накапливается в тканях головного мозга и сохраняется в течение нескольких дней. На основании полученных данных были отобраны образцы для дальнейшего иммуногистохимического анализа срезов головного мозга крыс.

Более того, существуют исследования, доказывающие, что распределение коэнзима Q_{10} в различных структурах мозга неодинаково. Самые высокие значения при применении $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ регистрируются в гиппокампе, черной субстанции, вентральном стриатуме и дорсолатеральном отделе стриатума, которые, как правило, в большей степени склонны к повреждению при нейродегенеративных заболеваниях (к примеру, таких, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона). На фоне

этого, современные данные о масс-спектрометрическом измерении содержания CoQ₁₀ в тканях мозга [125] заложили основу для разработки метода опосредованной оценки эффективности митохондриальной активности и/или повреждений в клетках ЦНС.

В связи с тем, что окислительный стресс и как результат его деятельности, окислительное повреждение липидов, белков, нуклеиновых кислот, являются причиной или, по меньшей степени, одним из факторов патогенеза множества нейродегенеративных заболеваний [115], нейропротективная активность CoQ₁₀ при болезни Альцгеймера [38, 125], болезни Паркинсона [115, 138], боковом амиотрофическом склерозе [85] и болезни Хантингтона [125] не является неожиданной. В том числе его развитие в следствии ишемического поражения головного мозга [15].

В отношении болезни Альцгеймера, следует подчеркнуть, что нейропатологические признаки болезни появляются на прогрессирующей стадии, когда уже возникает разрушение нейронов. При этом еще на ранней бессимптомной стадии происходит повреждение микрососудов головного мозга β -амилоидом (церебральная амилоидная ангиопатия). На сегодняшний день установлено, что повреждению нейронов предшествует повреждение эндотелиальных клеток [38, 103]. Действие β -амилоид воздействует на ГЭБ, нарушая его проницаемость и целостность, и как следствие происходит нарушение кровоснабжения, повреждение мелких кровеносных сосудов, ухудшение кислородного обмена и доставки питательных веществ. Протективное действие коэнзима от повреждений эндотелиальных клеток, вызываемых β -амилоидом, демонстрирует его способность снижать запас β -амилоида в клетках микрососудов головного мозга. В дополнение коэнзим Q₁₀ может снижать поступление внеклеточного Ca²⁺ и высвобождение Ca²⁺ из митохондрий, предотвращает усиление продукции АФК, опосредованное влиянием β -амилоида и открытие МРТ-мегаканалов в митохондриях, представляющих собой кальций-активируемые митохондриальные поры, что

в итоге не позволяет высвобождаться белкам с проапоптотической активностью в цитозоль. В результате CoQ₁₀ обеспечивает защиту эндотелиальных клеток, предотвращая их гибель, инициированную β-амилоидом, и возвращает их способность к восстановлению, ремоделированию и неангиогенезу [38].

К главному гистопатологическому признаку болезни Паркинсона относится селективная потеря дофаминергических нейронов черной субстанции в ЦНС, кроме того, происходит снижение выработки тирозингидроксилазы, требуемой для синтеза дофамина. Вследствие этого активность митохондриального комплекса I снижается, что приводит к потере электронов из митохондрий и в конечном счете вызывает окислительный стресс [115, 138]. Существует предположение, что окислительный стресс и дисфункция митохондрий могут играть ключевые роли в развитии болезни Хантингтона, при которой дефект конкретного гена способствует снижению энергетического метаболизма и приводит к дегенерации нейронов, окислительному повреждению биомакромолекул в клетках [67]. И хотя механизм развития патологии окончательно не установлен, эффективность CoQ₁₀ при данном заболевании доказана [115].

Во многих исследованиях показано, что старение сосудов влечет за собой нарушение эндотелиальных функций, связанных с усилением окислительного стресса и высвобождением целого ряда различных типов провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста и протеаз [56]. Нарушения биогенеза и биоэнергетики митохондрий в расстройствах во время старения, которые в дальнейшем могут перейти в хроническую ишемию головного мозга и нейродегенерацию. Также установлено, что содержание эндогенного CoQ₁₀ снижается с возрастом, при этом экзогенный CoQ₁₀ эффективно подавляет окислительный стресс и замедляет старение, что связано с предупреждением образования клеток секреторного фенотипа, характерного в процессе старения. У мышей CoQ₁₀ понижал уровень

свободных радикалов, увеличивал продукцию АТФ, стимулировал митохондриальную активность и биогенез, что сочеталось со снижением местного воспаления, улучшением пространственной и эпизодической памяти [112].

Также известно, что каскад противовоспалительных цитокинов в эндотелии головного мозга может запускаться от воздействия сигаретного дыма, путем рекрутирования лейкоцитов с их последующей адгезией к эндотелиальной стенке и проникновением через ГЭБ. Было показано, что CoQ₁₀ блокирует как начало, так и распространение окисления липидов и белков, помимо этого, он способен восстанавливать витамин E, чем дополнительно подавляет распространение окислительного повреждения клеточных компонентов при губительном влиянии на клетки ГЭБ [61]. Примечательно, что кофермент Q₁₀ совместно с α-токоферолом полезен как антиоксидант, предотвращающий развитие побочных эффектов противосудорожных препаратов [93]. Применение CoQ₁₀ у крыс с черепно-мозговой травмой снижает степень выраженности дегенерации нейронов [63].

Обобщая сказанное, можно отметить, что достоверно коэнзим Q₁₀ проявляет нейропротекторное действие, опосредованное снижением уровня окислительного стресса, нормализацией функций митохондрий и стимуляцией митохондриального биогенеза, но каким образом эти эффекты проявляются в клетках церебральных эндотелиоцитов, по-прежнему остается открытым вопросом. Также благодаря способности CoQ₁₀ проникать через ГЭБ, определяется его потенциал в роли агента, обладающего способностью воздействовать на метаболизм митохондриальных клеток нейроваскулярной единицы головного мозга (таких как церебральный эндотелий, периваскулярная астроглия, перициты, нейроны). Правда то, в какой степени

это может применяться в рамках настоящей медицинской практики, безусловно, нуждается в дополнительной экспериментальной оценке. Вне сомнения эндотелиоциты микрососудов головного мозга, экспрессирующие большое количество митохондрий, выступают мишенью для действия экзогенного коэнзима Q₁₀, тем не менее, что касается вопроса метаболизма и эффектов эндогенного коэнзима Q₁₀ в данных клетках во многом остается малоизученным. Главным образом, исследование влияния CoQ₁₀ на клетки церебрального эндотелия – интересное и перспективное направление в нейрофармакологии, которое позволяет открыть новые возможности предупреждения развития нейровоспаления и нейродегенерации.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе кафедры Фармакологии (заведующий кафедрой - д.м.н., профессор О.С. Медведев) ФГБОУ ВО факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова, и на кафедре биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии (заведующий кафедрой - д.м.н., профессор Н.А. Малиновская) и НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (руководитель НИИ - д.м.н., А.Н. Шуваев) ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Объект и методы исследования

Исследование состояло из двух экспериментальных частей *in vitro* и *in vivo*. Диссертационная работа проводилась с использованием клеточных культур астроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток (*in vitro*), и экспериментальных животных (*in vivo*).

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); состав: *действующее вещество*: убидекаренон – 10 мг (АО «НПО «Дом Фармации», Россия); *вспомогательные вещества*: макрогол глицерилрицинолеат – 80 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2304), полисорбат 20 – 40 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2709) аскорбиновая кислота – 1,0 мг (ФС 42-0218-07), натрия эдетат – 0,5 мг (ГОСТ 10652-73) натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02) – до 1 мл;

2. Убихинол, раствор для внутривенного введения 10 мг/мл (1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола, патент #RU2635993-C1); состав: *действующее вещество*: убидекаренол – 10 мг (АО «НПО «Дом Фармации», Россия); *вспомогательные вещества*: макрогол глицерилрицинолеат – 80 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2304), полисорбат 20 – 40 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2709) аскорбиновая кислота – 1,0 мг (ФС 42-0218-07), натрия эдетат – 0,5 мг (ГОСТ 10652-73) натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02) – до 1 мл;
3. Растворитель (плацебо раствора убихинола); состав: макрогол глицерилрицинолеат – 80 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2304), полисорбат 20 – 40 мг (Ph. Eur., 6.0, p.2709) аскорбиновая кислота – 1,0 мг (ФС 42-0218-07), натрия эдетат – 0,5 мг (ГОСТ 10652-73) натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02) – до 1 мл.

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).

Клеточная модель нейроваскулярной единицы in vitro. Часть исследования проведена на трехклеточной модели ГЭБ в условиях *in vitro* [16]. 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.

Протокол получения нейросфер и первичной культуры нейронов и астроцитов. Для получения нейросфер и первичной культуры нейронов и астроцитов новорожденных крыс (P4) помещали на лед, проводили декапитацию и извлекали головной мозг. Головной мозг помещали в чашку Петри, содержащую ледяной раствор 2% глюкозы в PBS, отделяли кору головного мозга и гиппокамп в культуральной чашке с раствором 2% глюкозы в PBS на льду. Полученную ткань переносили в пробирку со свежим раствором 2% глюкозы в PBS и ждали осаждения кусочков ткани (1-2 мин) с последующим удалением супернатанта, добавлением 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation (StemCell Technologies, Канада). Проводили тритурацию до получения однородной суспензии клеток и оставляли на 1 мин для осаждения крупных кусочков тканей. Через 1 мин собирали супернатант и переносили в новую стерильную пробирку для центрифугирования при 150G в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования проводили тритурацию в свежей культуральной среде. Определяли количество клеток с помощью гемоцитометра. Клетки засеивали в культуральные флаконы (T 75 см²) в 25 мл культуральной среды. Использовали пролиферативную среду NeuroCult® NS-A Proliferation (StemCell Technologies, Канада). Клетки инкубировали в условиях CO₂-инкубатора (Binder, Германия) при 5% CO₂ и температуре 37°C. Смену среды производили каждые 2 суток.

Дифференцировка нейросфер в нейроны и астроциты. После достижения нейросферами размеров 100—150 мкм производили

направленную дифференцировку нейросфер в нейроны и астроциты согласно методике, описанной ранее [69]. Дифференцировка нейросфер проводилась путем добавления в среду для культивирования факторов дифференцировки. В качестве питательной среды при дифференцировке нейросфер использовалась среда производства StemCell Technologies (Канада) – NeuroCult® NS-A Differentiation Medium. Через 7 и 14 суток культивирования нейросфер в дифференцировочной среде, открепляли клетки (нейроны, астроциты).

Изолирование и культивирование церебральных эндотелиальных клеток. Эндотелиальные клетки получали из микрососудов головного мозга крыс (P10). Выделение и получение первичной культуры клеток проводили в соответствии с протоколом [81]. Новорожденных крыс помещали на лед, проводили декапитацию и извлекали головной мозг. Головной мозг помещали в чашку Петри, содержащую ледяной раствор PBS. Удаляли твердую оболочку, мозжечок и ствол, оставляли только кору. Полученную кору измельчали в 3 мл ледяного DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) до кусочков размерами не более 1 мм³. К ткани добавляли смесь ферментов - колагеназа-2 (1 мг/мл), ДНКаза (15 мкг/мл) и проводили ресуспензирование, после чего взвесь клеток помещали в термостат на шейкере на 90 минут при 37°C. По окончании инкубации добавляли 10 мл DMEM, перемешивали, проводили центрифугирование и собирали осадок. К осадку добавляли 20% BSA в DMEM и повторно центрифугировали. Удаляли супернатант и к осадку добавляли DMEM с ферментами: колагеназа/диспаза (1 мг/мл) и ДНКаза (6,7 мкг/мл). Смесь клеток с ферментами помещалась в термостат на шейкере на 60 минут при 37°C. Через час проводили центрифугирование, собирали осадок и переносили его в градиент Перколла (33%) и центрифугировали 1 час. Слой эндотелиоцитов собирали шприцем, дважды отмывали в DMEM и производили посев в культуральной среде, содержащей: 20% PDS-

DMEM/F12 (plasma derived serum), FGFb (1 мг/мл), гепарин (100 мкг/мл), гентамицин (50 мкг/мл).

Полученные эндотелиальные клетки головного мозга фенотипировали с помощью моноклональных антител к эндотелиальному маркеру (ZO-1) по стандартному протоколу иммуногистохимического исследования с использованием первичных анти-ZO-1-антител (sc-8147, Santa Cruz Biotechnology Inc., США) и вторичных антител, помеченных флюорохромом Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam, Великобритания).

Создание трехклеточной модели гематоэнцефалического барьера in vitro. После образования монослоев клеток (астроциты, нейроны, эндотелиоциты) формировали модель ГЭБ *in vitro* в культуральной 24-луночной 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 на вставках помещали культуральные вставки с эндотелиоцитами в лунки планшета, в которых были астроциты и нейроны на дне лунок. Культивировали в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

Инкубация сокультуры клеток, сформированной в ГЭБ, в условиях in vitro с исследуемыми препаратами. Для проведения исследования были сформированы следующие экспериментальные группы: группа клеток модели ГЭБ в планшетах, во вставки которых добавляли 1% 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 [38, 117] и инкубировали в течение 15, 120 и 480 мин. 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).

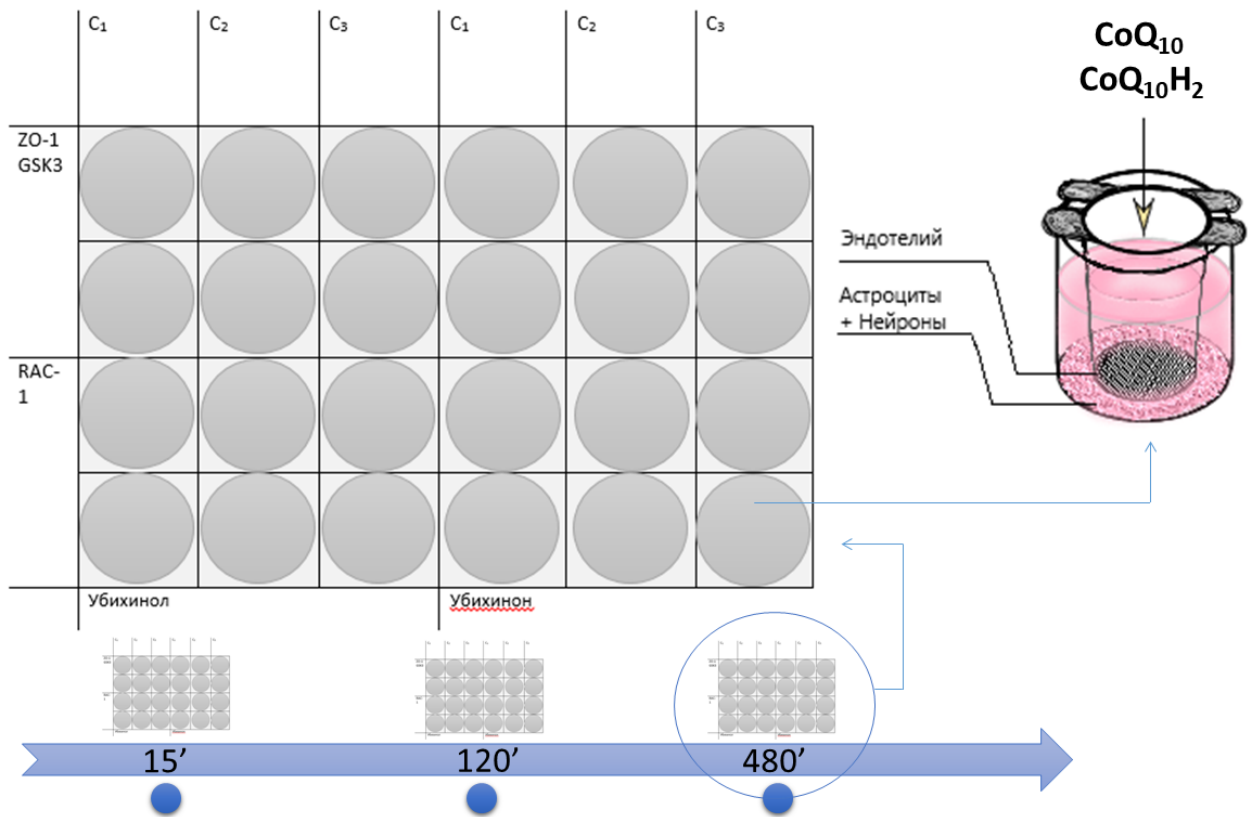


Рис. 4. Схематичный дизайн эксперимента: 24-луночный планшет, в который добавляли исследуемые растворы Убихинола ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) и Убихинона (CoQ_{10}) в различных концентрациях. По вертикали концентрации растворов C_1 – 1 мкМ, C_2 – 5 мкМ, C_3 – 10 мкМ Убихинола и Убихинона. По горизонтали иммунофлуоресцентное мечение антителами ZO-1, GSK-3 β , Rac-1. Справа схематичное изображение трехклеточной модели ГЭБ.

По истечении времени инкубации проводили оценку структурно-функциональной целостности монослоя эндотелиальных клеток во вставках

планшетов, после чего клетки фиксировали для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Оценка структурно-функциональной целостности ГЭБ in vitro. Во всех экспериментальных группах оценку структурно-функциональной целостности монослоя эндотелиальных клеток проводили путем измерения трансэндотелиального сопротивления (ТЭС). Использовали вольтметр EVOM2 (World Precision Instruments, США) с электродами STX2 с предварительной калибровкой в культуральной среде с культуральной вставкой. Величину ТЭС регистрировали в Ом*см². Контрольной группой для результатов, полученных при измерении ТЭС, являлись измерения в лунках, которые проводили перед добавлением исследуемых растворов.

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров ГЭБ. Иммуногистохимическое исследование 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 образцов и обработка результатов. Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Выполняли подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих данный антиген, на не менее чем 500 клеток в образце при анализе не менее 5 полей зрения. 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).

Статистическую обработку данных проводили в программе Prism 7 (GraphPad Software, США), методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Краскела-Уоллиса для всех результатов за исключением результатов ТЭС, для оценки которых использовался критерий Манна-Уитни, 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.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VIVO*

Экспериментальные животные. Работу проводили на 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.

Наркоз. Наркоз вызывали внутрибрюшинным введением хлоралгидрата (ХИММЕД, Россия) в дозе 300 мг на 1 кг веса животного.

Введение исследуемых препаратов. Экспериментальной группе животных вводили 1% раствор убихинола ($CoQ_{10}H_2$) однократно внутривенно в дозе 30 мг/кг с использованием полипропиленового катетера, вживленного в бедренную вену животного. Контрольной группе (К) вводили

физиологический раствор (Натрия Хлорид 0,9%, ООО «Гротекс»). Образцы крови и головного мозга брали у животных, которым вводили препарат через 2, 24, 96 и 192 ч после его введения [117], используя по 5 животных на каждую временную точку.

Декапитация. Для извлечения головного мозга проводили эвтаназию животных с помощью передозировки наркоза (хлоралгидрат, внутривенно). Затем снимали скальп с черепа крысы и ножницами перерезали позвоночник в области атлантозатылочного сочленения. С помощью костных кусачек Люэра осторожно разрушали черепную коробку, обнажая головной мозг. Затем отсекали мозжечок, головной мозг извлекали в стерильную чашку Петри, делили на ипси- и контралатеральные полушария. Сразу же проводили пробоподготовку одной части мозга для количественного определения содержания CoQ₁₀, а вторую помещали в 10% формалин (срок хранения проб до анализа не превышал 3 недели) для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Оценка окислительно-восстановительного статуса (редокс-статуса) при определении тканевого содержания коэнзима Q₁₀ в головном мозге и плазме крови крыс. Анализ тканевого содержания CoQ₁₀ проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием. Для этого образцы головного мозга гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора SONOPLUS mini 20 («BANDELIN-electronic», GmbHCo, KG, Germany), предварительно добавив в соотношении 1:4 (ткань:спирт) 96% раствор этанола. После получения однородной массы, 100 мкл гомогената отбирали и добавляли 500 мкл н-гексана, тщательно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут, и отбирали верхний слой. К пробе снова добавляли 500 мкл н-гексана и повторяли процедуру экстракции и отбора верхнего слоя. Объединенный экстракт упаривали досуха, сухой остаток растворяли в аликвоте 96% этанола. Образцы крови

центрифугировали в тех же условиях и отбирали 100 мкл плазмы из верхнего слоя. Для восстановления окисленной формы коэнзима Q₁₀ последовательно добавляли 10 мкл 5% раствора натрия тетрагидробората (NaBH₄), растворенного в 96% этаноле. 10 мкл восстановленного экстракта анализировали с помощью ВЭЖХ на оборудовании фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc.», (США): насос модели 580 и электрохимический детектор «Coulchem II», в изократическом режиме на колонке Luna 150x4,6 мм с сорбентом C18 (5 мкм) при скорости потока элюента 1,3 мл/мин. Подвижная фаза – 0,3% NaCl в смеси этанол: метанол: 7% HClO₄ (970:20:10). Электрохимическое детектирование осуществляли в окислительном режиме с помощью аналитической ячейки (model 5011) при напряжении на первой паре электродов -50 мВ и +350 мВ – на второй. Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc.», (США) [64]. Экстракт анализировали до и после полного восстановления до CoQ₁₀H₂ (с помощью добавления раствора натрия тетрагидробората в этаноле). 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 (%). По данным литературы и результатам кафедры [57, 64] содержание эндогенного CoQ₁₀ в плазме крови крысы составляет менее 0,1 мкг/мл. Такая концентрация находится за пределами валидированного диапазона методики (нижний предел количественного определения – 0,25 мкг/мл), поэтому количественная оценка исходных концентраций CoQ₁₀ в плазме не проводилась.

Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров ГЭБ. Оценку 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.

Окраску проводили в 24-луночных планшетах, все этапы окраски и промывки проводили с использованием шейкера. Антитела в лунку планшета добавляли в объеме 300 мкл, промывали в растворе фосфатного буфера (PBS – Phosphate Buffere Saline) объемом 500 мкл. До блокады неспецифической активности проводили демаскирование срезов, которое состояло из двух этапов. Сначала срезы обрабатывали протеиназой К в финальной концентрации 50 мкг/мл (100 мкл маточного раствора разводили в 10 мл PBS) и инкубировали в течение 5 мин в термостате при температуре 37°C. Затем срезы нагревали в микроволновой печи, поместив в контейнер с дистиллированной водой, в течение еще 5 мин.

Неспецифическую активность блокировали 2-часовой инкубацией при комнатной температуре в промывочном растворе (0,2% Тритона X-100 в PBS). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C в растворе PBS, содержащем 0,2% Тритона X-100 и 3% BSA (AB-раствор); затем продолжали инкубацию 2 ч при комнатной температуре. Использовали антитела против CD31 в разведении 1:200 (550300, Vecton Dickinston, 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-3 β 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. На всех этапах осуществляли 2–3-кратную промывку образцов в течение 5 мин промывочным раствором. Завершающим этапом был перенос срезов на стекло и нанесение 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 (участок, отвечающий за долговременную память, а также нейрогенез), базолатеральная часть миндалина (отвечающая за эмоциональную память) и энторинальная кора (связующее звено между ассоциативными областями неокортекса и гиппокампом) [125].

Оценка апоптоза. 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. Метод позволяет распознать разрывы нитей ДНК (связывание 3'-ОН-концов с мечеными нуклеотидами с помощью фермента TdT). Срезы инкубировали в реакционной смеси раствора (200–300 мкл) с TdT и нуклеотидами, мечеными авидин-FITC. Ядра клеток окрашивали йодистым пропидием (PI) в присутствии ДНКазы в течение 15 мин при комнатной температуре. Окраску проводили в 24-луночных планшетах (200–300 мкл смеси в лунке), все этапы окраски и промывки проводили с использованием шейкера. Срезы промывали двумя сменами PBS объемом 500 мкл по 2 мин, переносили срезы на стекла, препарат накрывали покровным стеклом и микроскопировали.

Микроскопия образцов и обработка результатов. Использовали флуоресцентный микроскоп ZOE (Bio-Rad, США) и полностью автоматизированный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus FV10i-W (Olympus, Япония). При анализе фотоснимков использовали программу ImageJ (версия 1.52p). Считали относительное количество клеток (в %), имеющих соответствующие антигены, от общего числа клеток в поле зрения. Во всех случаях анализировали не менее 5 полей зрения.

Статистическую обработку результатов ВЭЖХ анализа проводили в программе «Statistica for Windows 6.0. Достоверность отличий определяли с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. При статистической обработке остальных данных использовали программу Prism 7 (GraphPad Software, США) и методы непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Краскела-Уоллиса 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.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на проницаемость ГЭБ в условиях *in vitro*

Оценка проницаемости ГЭБ проводилась путем измерения величины ТЭС. В соответствии с полученными значениями можно делать следующие суждения: 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 CoQ_{10} (Рис. 5) и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (Рис. 6) относительно величины ТЭС до добавления препаратов.

При добавлении в культуральную среду CoQ_{10} в концентрации 1 мкМ через 15 мин ТЭС снизилось на 2,7%, после 120 мин действия на 13,7% и на 11% после 480 мин относительно исходной точки. 5 мкМ CoQ_{10} через 15 мин повышает ТЭС на 7,6%, а через 120 мин снижает на 9,2% и до 9,5% через 480 мин. 10 мкМ CoQ_{10} через 15 мин повышает ТЭС на 3,7%, а через 120 мин снижает до 9,8%, после чего величина снова возрастает через 480 мин и становится ниже значения К на 6,7%.

$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 1 мкМ через 15 мин повышает значение ТЭС на 0,4% выше, а затем через 120 мин зафиксировано снижение величины ТЭС на 15,9%, которое продолжалось до 480 мин наблюдения, когда величина ТЭС уменьшилась на 17,5%. 5 мкМ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ через 15 мин повышает ТЭС на 7,3%, а через 120 мин снижает на 1,4% и до 10,3% через 480 мин. 10 мкМ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ повышает ТЭС на 16,9% после 15 мин его воздействия, через 120 мин значение снижается, но остается выше К на 4,5%, и через 480 мин снижается до 5%.

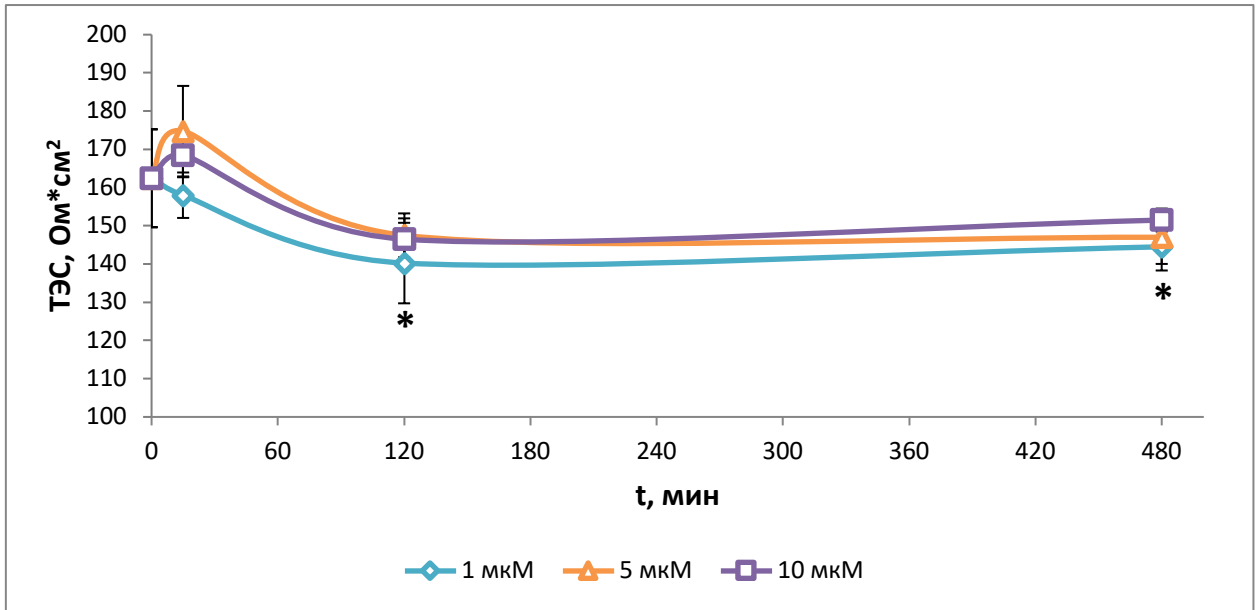


Рис. 5. Изменение величины ТЭС ($\text{Ом}\cdot\text{см}^2$) после воздействия CoQ_{10} в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ на клетки модели ГЭБ в зависимости от времени. * – статистически значимые отличия от К, $p \leq 0,01$ (Критерий Манна-Уитни)

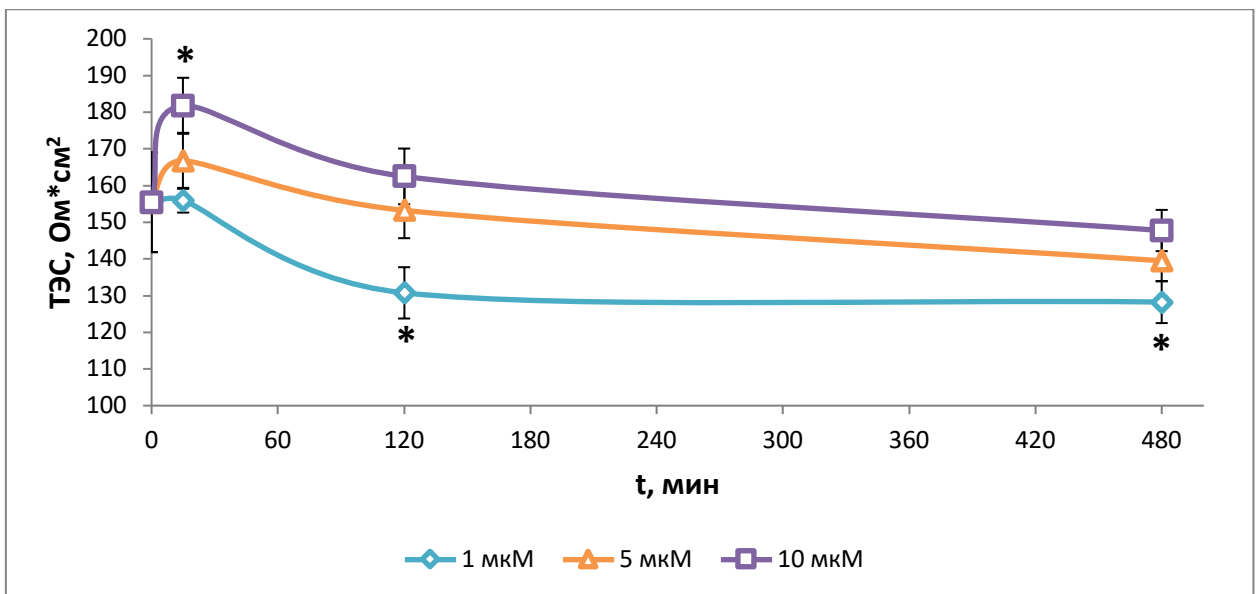


Рис. 6. Изменение величины ТЭС ($\text{Ом}\cdot\text{см}^2$) после воздействия $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ на клетки модели ГЭБ в зависимости от времени. * – статистически значимые отличия от К, $p \leq 0,01$ (Критерий Манна-Уитни)

В группе Р (Рис. 7), 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 клетки модели ГЭБ. При добавлении 86 мкл плацебо-раствора (эквивалентно 1 мкМ препарата) наблюдалось снижение на 0,5% через 15 мин, затем увеличение на 4,4% через 120 мин и снова снижение до 5,6% через 480 мин. При добавлении 430 мкл плацебо-раствора (эквивалентно 5 мкМ препарата) наблюдалось снижение на 0,5% через 15 мин, затем увеличение на 3,1% через 120 мин и снова снижение до 9% через 480 мин. При добавлении 860 мкл плацебо-раствора (эквивалентно 10 мкМ препарата) наблюдалось снижение на 2,1% через 15 мин, значение сохранялось и через 120 мин, после чего снижалось до 7% через 480 мин.

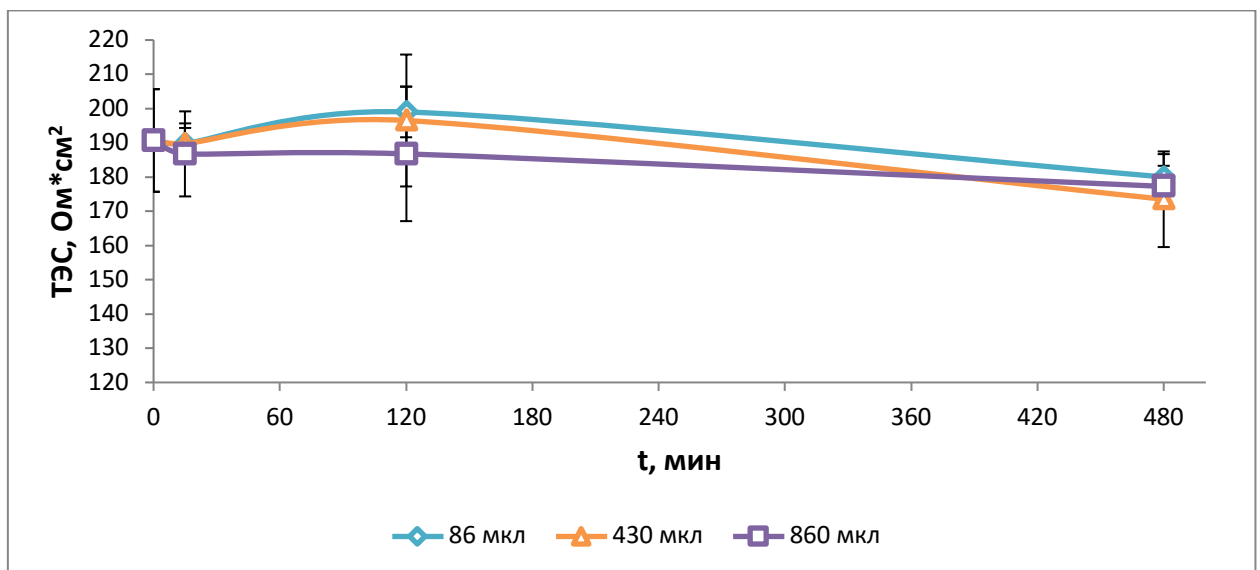


Рис. 7. Изменение величины ТЭС ($\text{Ом} \cdot \text{см}^2$) после воздействия растворителем на клетки модели ГЭБ в зависимости от времени

По результатам исследования установлено, что CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ оказывают влияние на величину ТЭС в модели ГЭБ *in vitro*. Так как ТЭС является интегральным показателем целостности ГЭБ, обусловленным наличием и функцией белков плотных контактов [121], этот факт может

свидетельствовать об изменении проницаемости ГЭБ при воздействии использованных в работе веществ. При этом установлено, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ проявляет дозозависимый эффект, то есть при его различных концентрациях изменения ТЭС оказались различными. 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, $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в разных концентрациях оказывает разное влияние на проницаемость ГЭБ.

В отношении CoQ_{10} 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.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами [20].

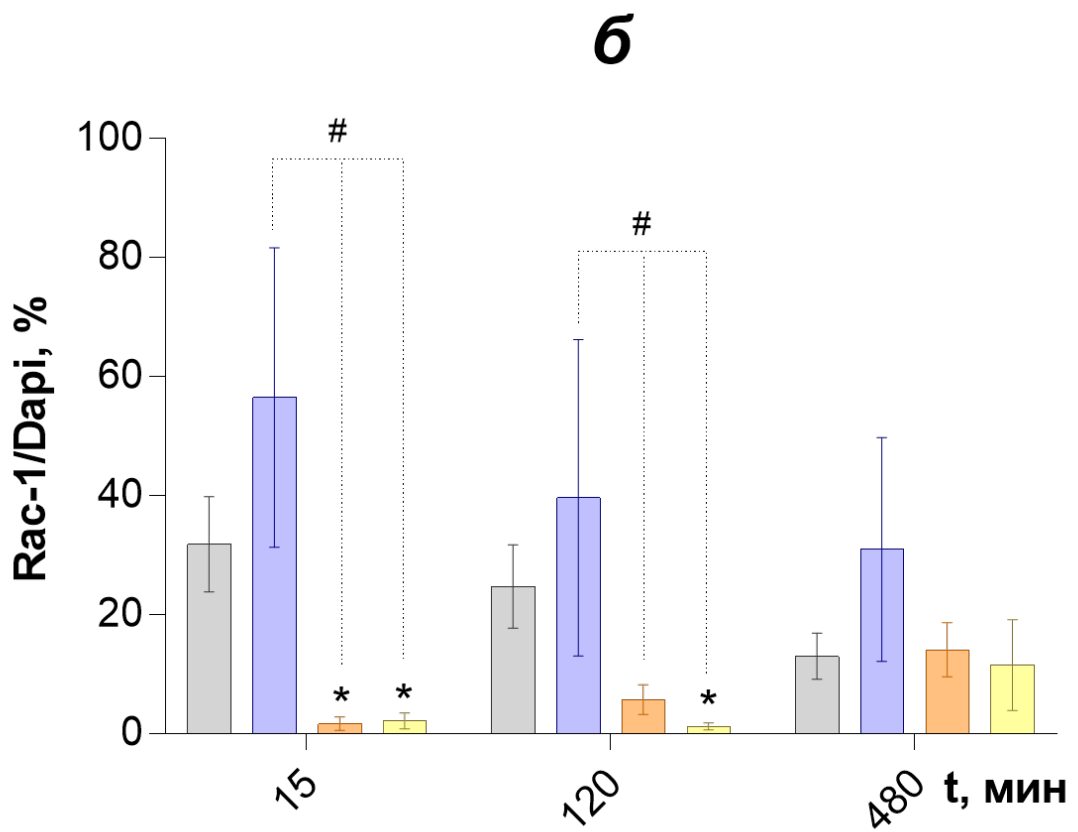
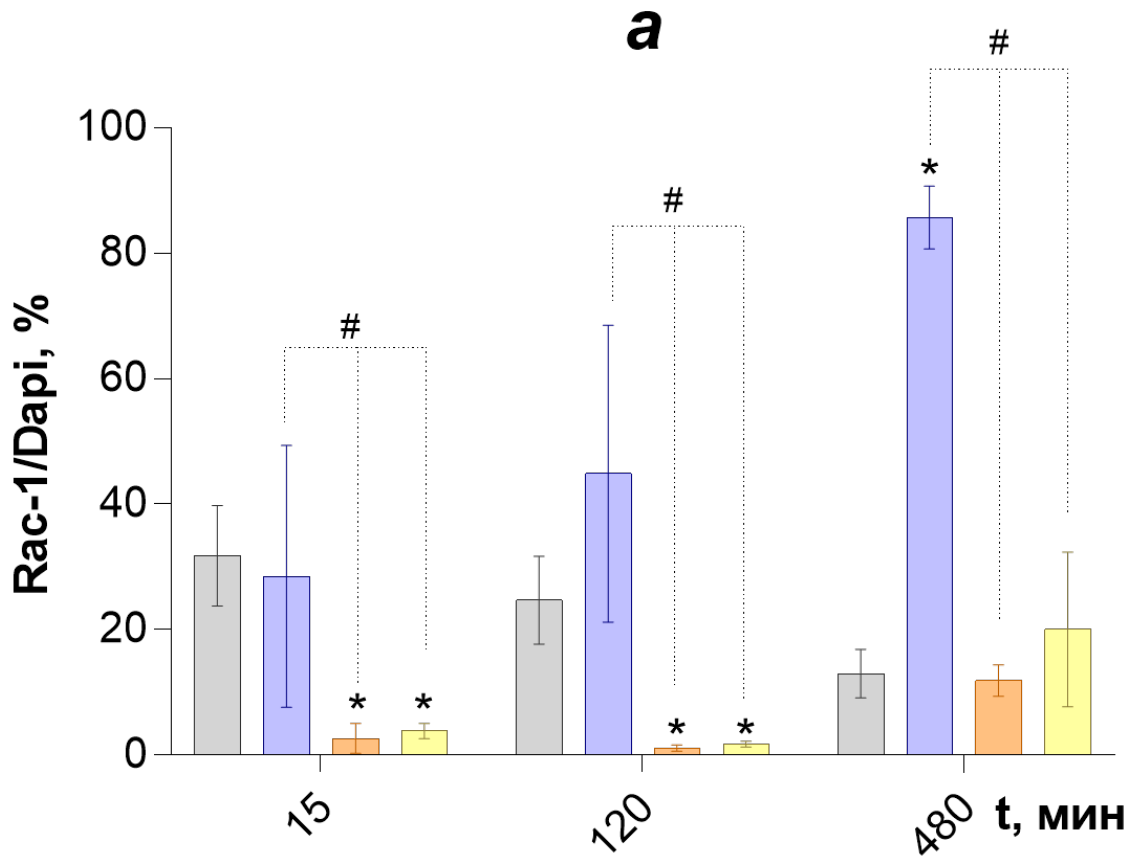
Экспрессия белка Rac-1

Оценка экспрессии белка Rac-1 на трехклеточной модели ГЭБ in vitro

В диссертационной работе проводилась оценка изменения количества Rac-1-иммунопозитивных клеток при воздействии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки ГЭБ (Рис. 9). В ходе исследования выявлено, что обе формы коэнзима Q₁₀ вызвали статистически значимое уменьшение количества эндотелиальных клеток, которые экспрессируют белок Rac-1 по сравнению с группами К и Р (Рис. 8). Изменения наблюдались уже через 15 мин действия CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*.

В концентрации 1 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ через 15 мин статистически значимо снижали экспрессию белка Rac-1 до 2,66% ($p \leq 0,0001$) и 3,86% ($p \leq 0,01$), соответственно, по сравнению с контрольной группой (К), где значение составляло 31,8%. Через то же время значение экспрессии Rac-1 при действии растворителя (Р) в эквивалентном объеме (86 мкл) составляло 28,5%. При этом влияние растворителя не отличалось статистически значимо от влияния К, а статистически значимые отличия наблюдались между значениями растворителя и экспериментальными группами CoQ₁₀ ($p \leq 0,01$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,05$).

Через 120 мин в той же концентрации 1 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ снижение экспрессии достигло 1,12% ($p \leq 0,01$) и 1,75% ($p \leq 0,05$), соответственно, относительно К, равной 24,73%. Значение в группе растворителя при этом составляло 44,87%, что было выше, но статистически достоверно не отличалось от К. Значения экспериментальной группы и группы растворителя статистически значимо не отличались. При этом влияние растворителя статистически значимо отличалось от экспериментальных групп CoQ₁₀ ($p \leq 0,0001$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,01$).



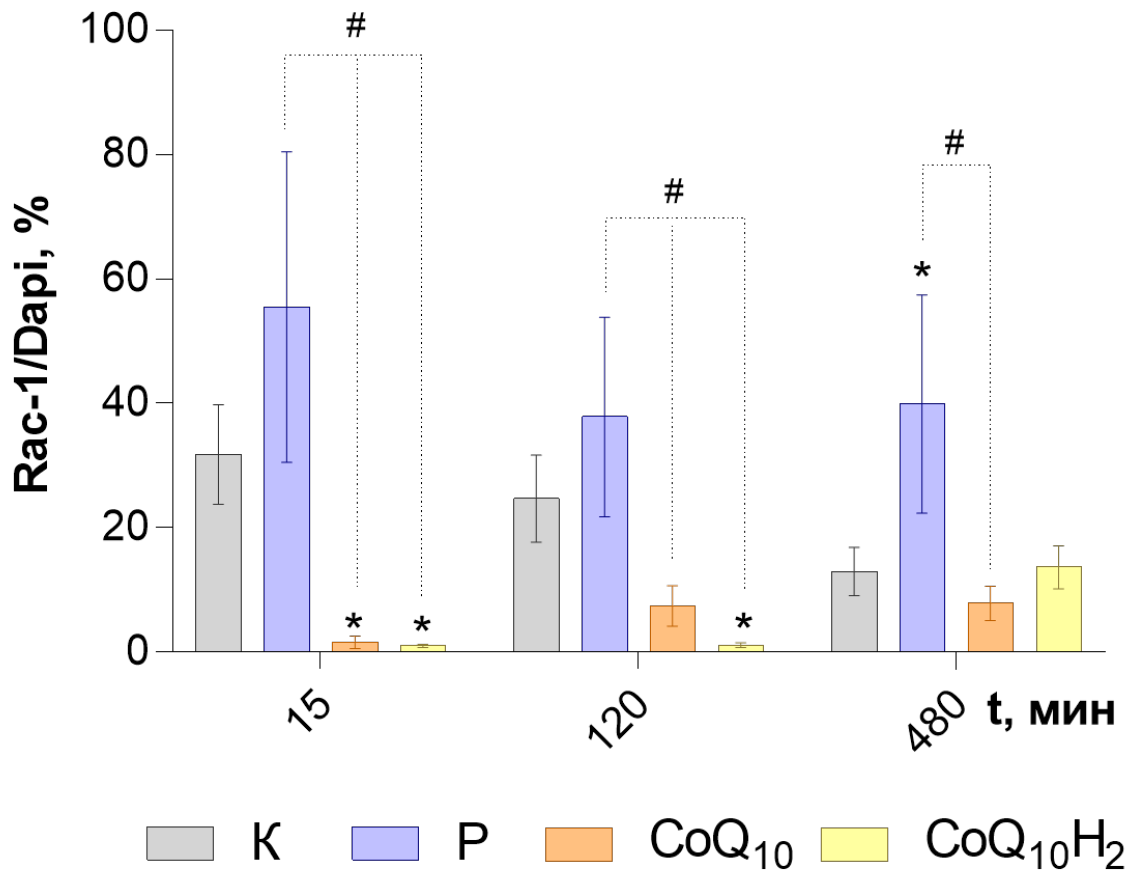
в

Рис. 8. 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 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)

После 480 мин действия препаратов CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ значения экспрессии Rac-1 составляли 11,87 и 20,04%, соответственно, что статистически достоверно не отличалось от К (где значение составляло 12,99%). Максимального повышения экспрессии Rac-1 среди остальных концентраций и временных интервалов достигло значение влияния растворителя в эквивалентном объеме (86 мкл), которое составило 85,68% ($p \leq 0,05$) и статистически достоверно отличалось от К. Влияние растворителя

также статистически значимо отличалось от влияния экспериментальной группы CoQ₁₀ ($p \leq 0,05$).

Действие 5 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в течение 15 мин на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ статистически достоверно снизило значение экспрессии белка Rac-1 до 1,65% ($p \leq 0,01$) и 2,1% ($p \leq 0,01$), соответственно, относительно К (31,8%). Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (430 мкл) повысил экспрессию до 56,46%, что не отличалось статистически значимо от К. При этом статистически значимые отличия наблюдались между значениями группы растворителя и экспериментальных групп CoQ₁₀ ($p \leq 0,0001$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,0001$).

Значения экспрессии белка Rac-1 через 120 мин при влиянии CoQ₁₀ в концентрации 5 мкМ снизилось до 5,7%, а при влиянии CoQ₁₀H₂ статистически значимо снизилось до 1,22% ($p \leq 0,0001$), относительно контрольной группы (24,73%). Значение экспрессии при действии растворителя составило 39,61%, что статистически значимо не отличалось от группы К. Отличия значений экспериментальных групп CoQ₁₀ ($p \leq 0,05$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,0001$) и группы растворителя были статистически значимыми.

Значения экспрессии Rac-1 CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрации 5 мкМ через 480 мин составили 14,08 и 11,51%, соответственно, что статистически достоверно не отличалось при значении контроля 12,99%. Растворитель за тот же отрезок времени статистически увеличил значение экспрессии Rac-1 до 30,93%. Статистически значимых отличий между группой растворителя, экспериментальными группами и группой К не было.

В концентрации 10 мкМ препараты CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ через 15 мин действия статистически значимо снижали экспрессию Rac-1 до 1,63% ($p \leq 0,01$) и 1,04% ($p \leq 0,01$), соответственно, относительно контрольной группы равной 31,8%. Такое снижение экспрессии белка после действия CoQ₁₀H₂ определяется как максимальное среди остальных концентраций и временных

интервалов. Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (860 мкл) повысил экспрессию до 55,5%, что не являлось статистически значимым в отношении К. При этом статистически значимыми были отличия между значениями экспериментальных групп CoQ₁₀ ($p \leq 0,001$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,0001$) и группой растворителя.

Через 120 мин действия 10 мкМ CoQ₁₀ значение экспрессии белка Rac-1 составило 7,46%. Через то же время при действии CoQ₁₀H₂ значение экспрессии статистически значимо относительно К (24,73%) снизилось до значения 1,14% ($p \leq 0,001$). Значение в группе растворителя составляло 37,85%. Отличия экспериментальных групп CoQ₁₀ ($p \leq 0,05$) и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,0001$) от группы растворителя являлись статистически значимыми.

И наконец, через 480 мин действия препаратов в той же концентрации, значения экспрессии для CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ составили 7,9% и 13,69%. Относительно К не было статистически значимых отличий ни у одной из экспериментальных групп. Действие растворителя в тот же отрезок времени составило значение 39,9% ($p \leq 0,05$), что статистически значимо отличалось от К, в которой составляло 12,99%. Помимо этого, статистически значимые отличия наблюдались между группой растворителя и группой CoQ₁₀ ($p \leq 0,0001$).

Статистически достоверных отличий между действием CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп.

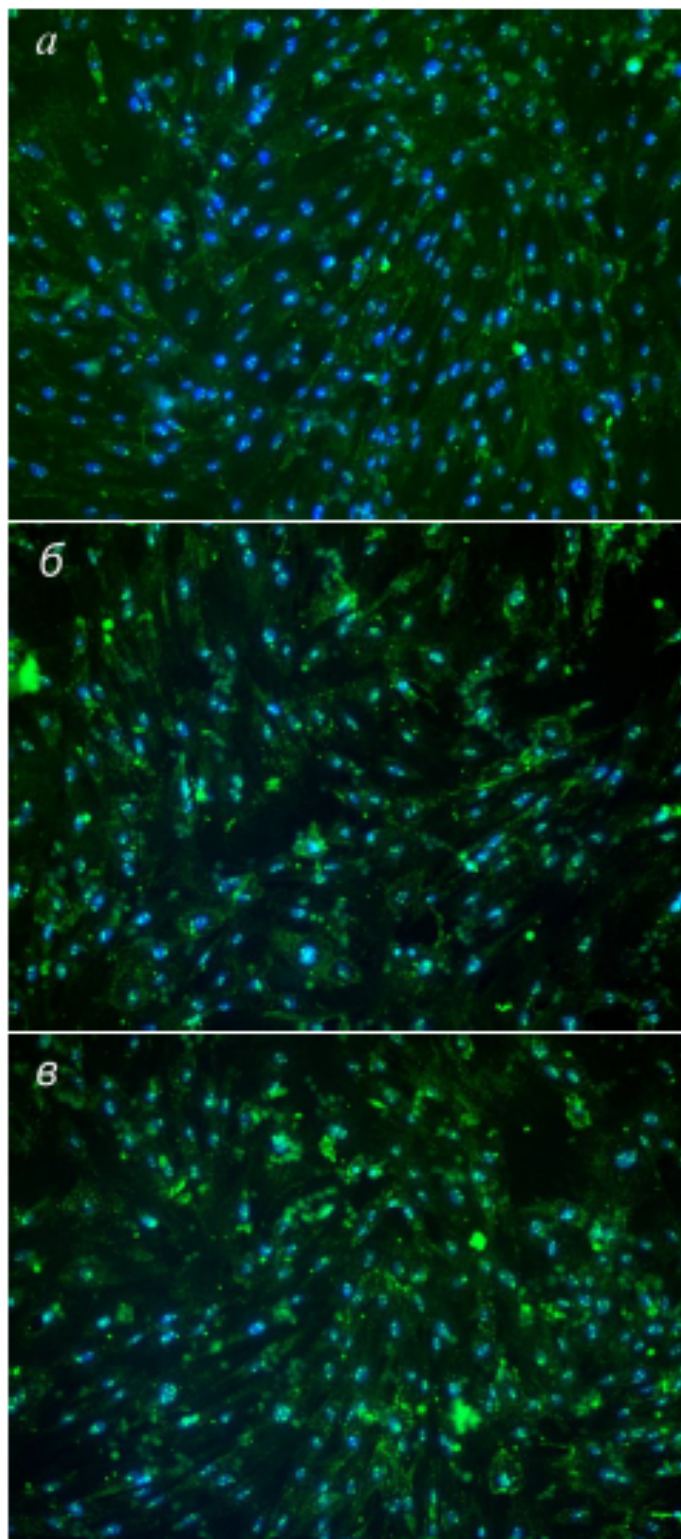


Рис. 9. Иммуноцитохимическое выявление белка Rac-1 в клетках модели ГЭБ. *а* – Контроль (К), *б* – после воздействия $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, *в* – после воздействия CoQ_{10} . Ядра клеток – синий цвет (DAPI), Rac-1-иммунопозитивные клетки – зеленый цвет. Увел. об.: $20\times$

Оценка экспрессии белка Rac-1 на монослое клеток эндотелия in vitro

Для полной оценки влияния CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ также проводилась оценка экспрессии белка Rac-1 после 15, 120 и 480 мин воздействия препаратами на монокультуру клеток церебрального эндотелия в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ (Рис. 10). 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*. В концентрации 1 мкМ CoQ₁₀ через 15 мин снижал экспрессию белка Rac-1 до 7,87%. Через то же время при действии 1 мкМ CoQ₁₀H₂ значение экспрессии относительно К (11,76%) возросло до 19,5%, но не являлось статистически значимым. При этом статистически значимые отличия наблюдались между значениями экспериментальных групп препаратов CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,001$).

Через 120 мин в той же концентрации 1 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ повышали экспрессию Rac-1 статистически достоверно до 46,42% ($p \leq 0,05$) и 77,13% ($p \leq 0,0001$), соответственно, относительно группы К, составлявшей 7,52%. Значения экспериментальных групп статистически значимо друг от друга не отличались.

После 480 мин действия CoQ₁₀ в концентрации 1 мкМ значение экспрессии Rac-1 составило 31,5%, что статистически значимо не отличалось от К (12,99%). Действие CoQ₁₀H₂ в тот же временной отрезок статистически значимо увеличило экспрессию белка до 84,7% ($p \leq 0,0001$) по сравнению с контрольной группой. Также статистически значимо отличались между собой значения экспериментальных групп CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,05$).

Значение экспрессии Rac-1 при действии 5 мкМ CoQ₁₀ в течение 15 мин составило 14,1%. В той же концентрации CoQ₁₀H₂ статистически достоверно

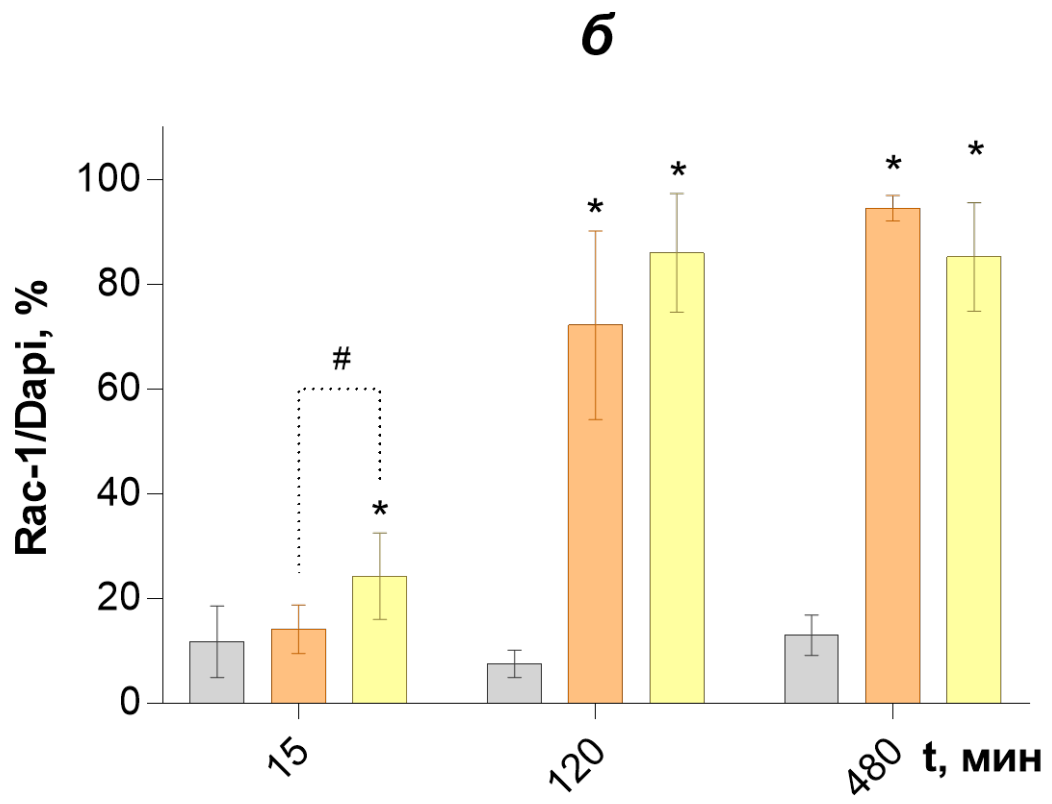
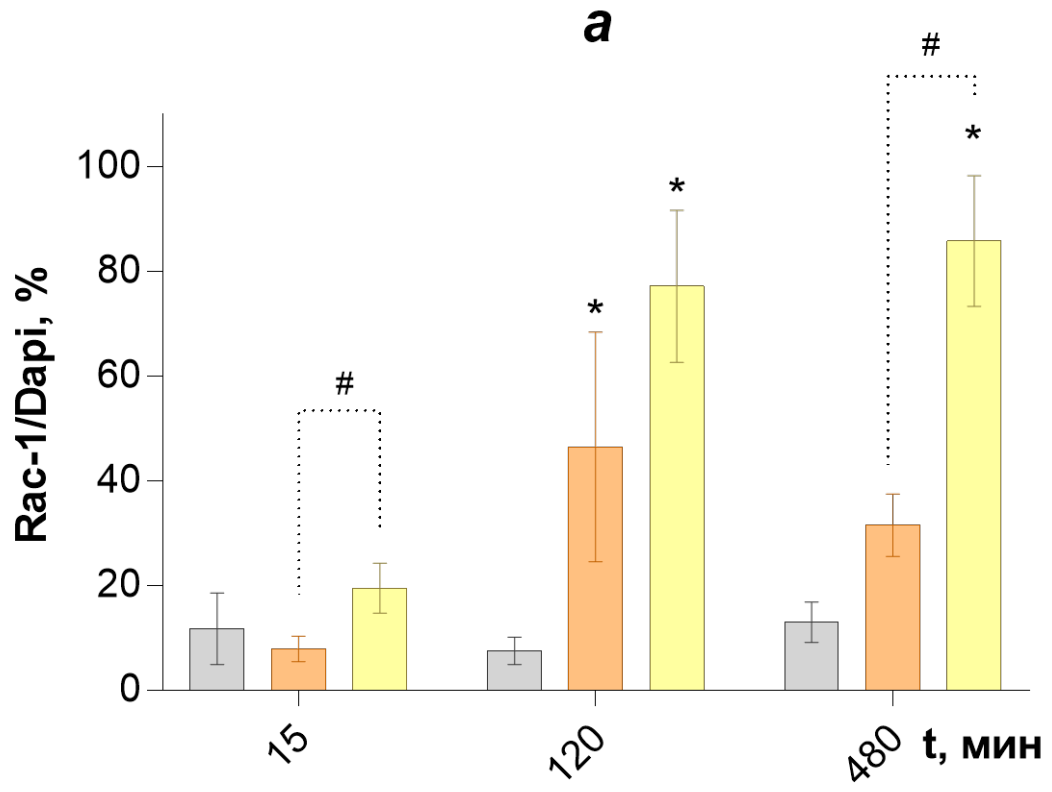
по отношению к контрольной группе (при значении 11,76%) повысил экспрессию до 24,23% ($p \leq 0,01$). Помимо этого, статистически значимые отличия наблюдались между значениями групп препаратов ($p \leq 0,05$).

Через 120 мин значения экспрессии белка Rac-1 при влиянии CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрации 5 мкМ, статистически значимо увеличивались до 72,15% ($p \leq 0,05$) и 85,98% ($p \leq 0,001$), соответственно, относительно контрольной группы (7,52%). Между собой экспериментальные группы статистически значимо не отличались.

Также и через 480 мин значения экспрессии после влияния 5 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ были статистически выше К (12,99%) и составляли 94,5% ($p \leq 0,01$) и 85,22% ($p \leq 0,05$), соответственно. Отличия значений экспериментальных групп при этом не являлись статистически значимыми.

Экспрессии Rac-1 при действии в течение 15 мин CoQ₁₀ в концентрации 10 мкМ составила 12,97%. В той же концентрации CoQ₁₀H₂ статистически достоверно относительно К (11,76%) увеличил экспрессию до 70,69% ($p \leq 0,0001$). Помимо этого, статистически значимые отличия наблюдались между значениями групп CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ ($p \leq 0,01$).

Через 120 мин действия 10 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂, экспрессия белка статистически значимо увеличилась до 94,77% ($p \leq 0,01$) и 89,91% ($p \leq 0,01$), соответственно, по сравнению с К (7,52%). Отличия значений экспериментальных групп не являлись статистически значимыми.



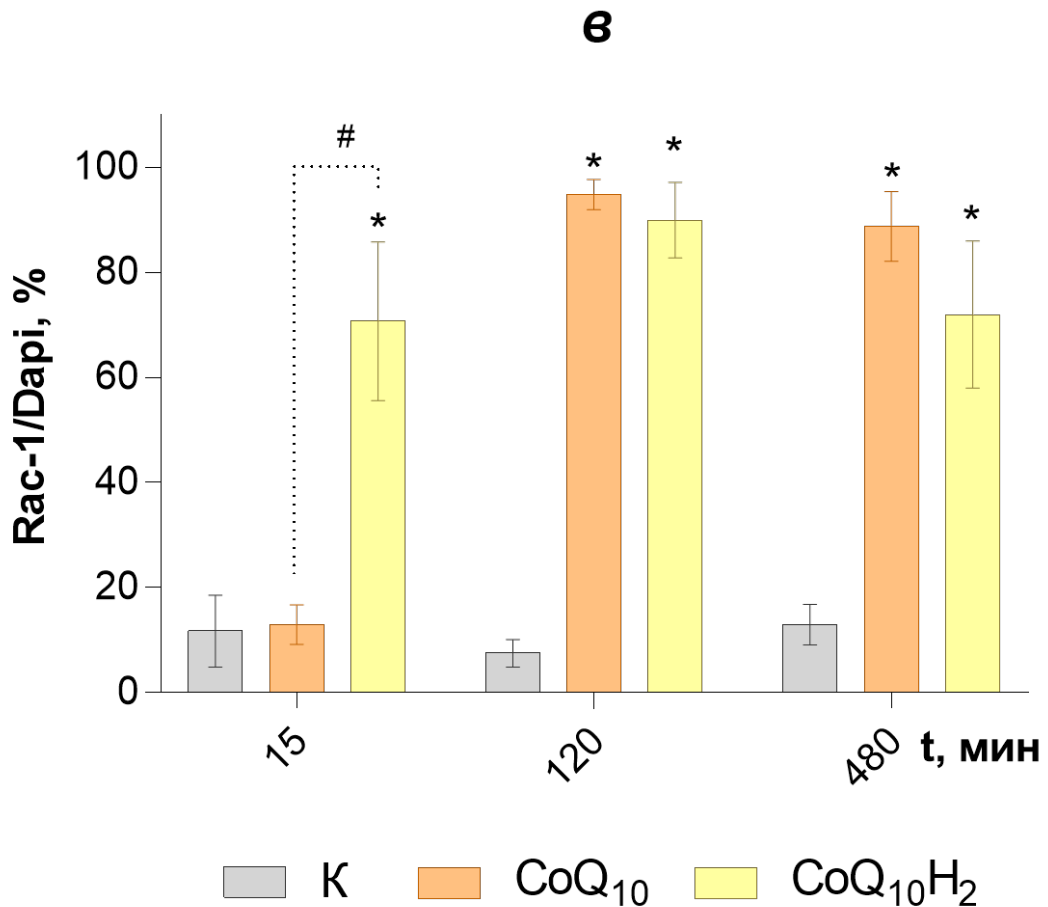


Рис. 10. Влияние CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1 (а), 5 (б) и 10 мкМ (в) на экспрессию белка Rac-1 в монослое эндотелиальных клеток головного мозга в зависимости от времени инкубации. * – статистически значимые отличия от контроля (К); # – статистически значимые отличия между экспериментальными группами препаратов; $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

И наконец, через 480 мин значения экспрессии после влияния 10 мкМ CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ были по-прежнему статистически выше контрольной группы (12,99%) и составляли 88,74% ($p \leq 0,0001$) и 71,95% ($p \leq 0,05$), соответственно. Между собой экспериментальные группы статистически значимо не отличались.

Белок Rac-1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 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 [50, 111]. 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 [82, 127].

В регуляции функциональной активности Rac-1 задействовано большое количество белков, которые могут способствовать его рекрутированию, активации, дезактивации или стабильности. Активированный Rac-1 можно обнаружить во время таких процессов, как миграция клеток, инвазия и повреждение ДНК [105]. С активацией Rac-1 в клетках связан также апоптоз [91]. Одной из функций белка Rac-1 также является регуляция продукции АФК в митохондриях [133]. Активированный Rac-1 (Rac-GTP) стимулирует фермент НАДФ•Н-оксидазу (NOX), что приводит к усилению продукции АФК [123].

Учитывая, что высокие уровни экспрессии Rac-1 клетками ГЭБ ассоциированы с повреждением и повышением проницаемости ГЭБ, усилением апоптоза клеток и митохондриальной недостаточностью [62], а эффекты CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ проявляются в уменьшении количества Rac-1-иммунопозитивных клеток, можно предполагать потенциальную возможность применения этих веществ в роли терапевтических агентов. Обсуждая влияние CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на экспрессию Rac-1, можно сделать вывод о том, что оба изучаемых вещества влияют на количество Rac-1-иммунопозитивных клеток. Снижение экспрессии при воздействии обоими препаратами на клетки ГЭБ *in vitro* наблюдали в течение 2 ч. При этом

максимальный эффект характерен для $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 10 мкМ, в этом случае наблюдали уменьшение количества Rac-1-иммунопозитивных эндотелиоцитов приблизительно в 31,5 раза относительно контроля. Данный эффект развивался стремительно и наблюдался уже через 15 мин.

Эффект CoQ_{10} , который наблюдали уже через 15 мин, имел место при различных концентрациях действующего вещества. Однако максимально длительным (120 минут) и сильным он был при концентрации 1 мкМ, в этом случае наблюдали уменьшение количества клеток, экспрессирующих Rac-1 в 22 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, остается актуальным вопрос об эффективной концентрации CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, необходимой для реализации терапевтического эффекта. Так в работе Niu с соавторами [99], посвященной изучению влияния $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 0-400 мкМ на ооциты млекопитающих, авторы убедительно показали наличие максимально выраженного положительного эффекта при концентрации 100 мкМ.

В другом исследовании изучалось влияние $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на организм молодых спортсменов, которые получали препарат в дозе 200 мг/сут в течение 1 мес. Оценивали физические и гематохимические показатели, содержание $\text{CoQ}_{10}/\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме, уровень внутриклеточных АФК, состояние митохондриальной мембраны и параоксоназы (универсального фактора антиоксидантной защиты в организме человека), а также уровня окислительного повреждения ДНК. Авторы указывают, что добавки $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ предотвращали, вызванную физическими упражнениями, депривацию коэнзима и снижение активности параоксоназы, снижение цитоплазматических АФК в моноклеарных клетках. Однако потенциал митохондриальной мембраны и окислительное повреждение ДНК не изменялись [102].

При изучении влияния CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 200 мг/сут в течение 2 недель у пожилых людей оказалось, что более эффективным оказался $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, а не CoQ_{10} . Однако, в обеих группах, несмотря на уменьшение концентрации АФК в мононуклеарных клетках периферической крови, общие показатели оксидативного стресса по результатам анализа периферической крови не изменились [143]. Кроме этого, указывается, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ способен проникать в ткани, в том числе и головной мозг через ГЭБ, и оказывать свое антиоксидантное действие в концентрации более $2,78 \text{ мкМ/л}^{-1}$. Однако в отмеченных выше исследованиях использовался пероральный путь введения препаратов.

Результаты экспрессии Rac-1 после действия CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, 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.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами [20].

Оценка экспрессии GSK-3 β на трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*

По результатам иммуногистохимического анализа, проводимого *in vitro* на трехклеточной модели ГЭБ, CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ через 15 мин повышал экспрессию GSK-3 β до 41,66% относительно контрольной группы (К), в которой значение составляло 29,2% (Рис. 11). Через то же время растворитель (Р) в эквивалентном объеме (86 мкл) статистически значимо относительно К повышал экспрессию до 84,14% ($p \leq 0,0001$). При этом статистически значимые отличия наблюдались между значениями экспериментальной группы CoQ₁₀H₂ и группой растворителя ($p \leq 0,05$).

Через 120 мин в той же концентрации 1 мкМ CoQ₁₀H₂ повышал экспрессию GSK-3 β до 80,57% относительно К, равной 76,86%. Значение в группе растворителя при этом составляло 97,07% ($p \leq 0,01$), что статистически достоверно отличалось от К. Значения экспериментальной группы и группы растворителя статистически значимо не отличались.

После 480 мин действия препарата в той же концентрации 1 мкМ, относительно К (где значение составляло 38,15%), CoQ₁₀H₂ статистически значимо увеличил экспрессию GSK-3 β до 99,21% ($p \leq 0,001$). Такое повышение экспрессии GSK-3 β после действия препарата определяется как максимальное среди остальных концентраций и временных интервалов. При этом действие растворителя в такой же отрезок времени было ниже и составляло 82,02%. Статистически значимых отличий группы растворителя не было ни в сравнении с группой препарата, ни с контрольной группой.

Действие 5 мкМ CoQ₁₀H₂ в течение 15 мин на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ увеличило значение экспрессии GSK-3 β до 37,77% относительно К (29,2%). Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (430 мкл) статистически значимо относительно К повысил экспрессию до 75,59% ($p \leq 0,0001$). При этом статистически

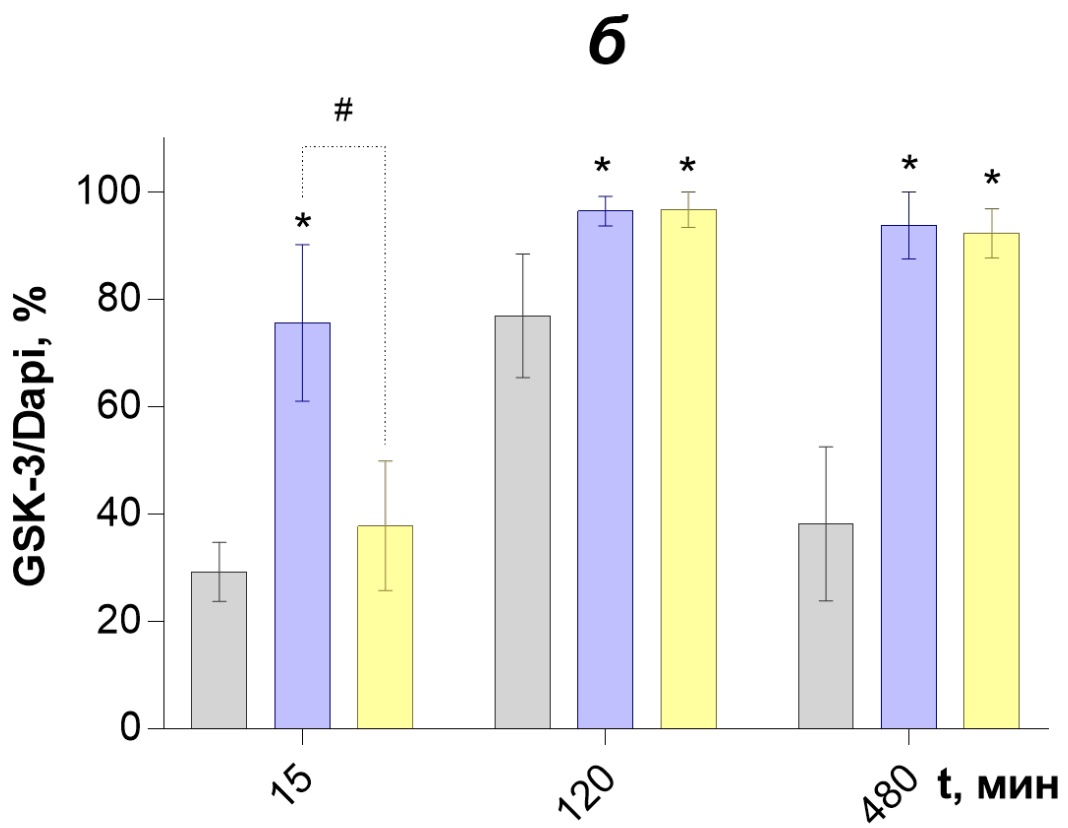
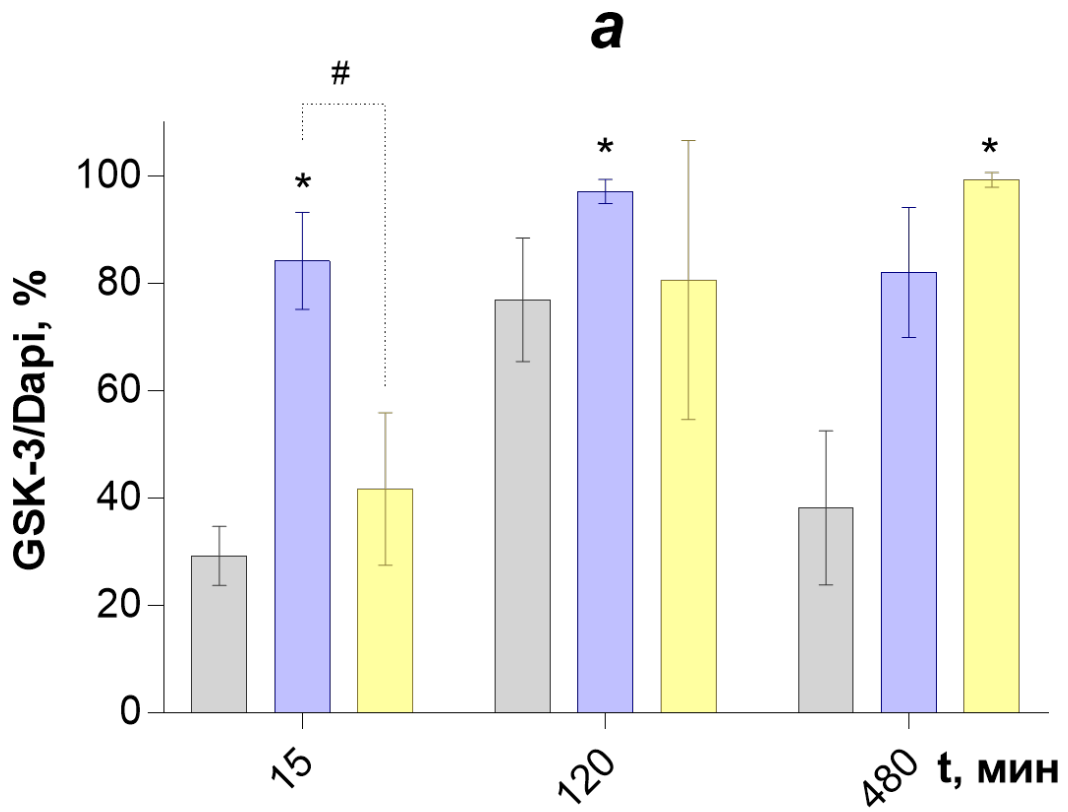
значимые отличия также наблюдались между значениями группы $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и группы растворителя ($p \leq 0,01$).

Значение экспрессии GSK-3 β через 120 мин при влиянии $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 5 мкМ, статистически значимо увеличилось до 96,65% ($p \leq 0,01$) относительно контрольной группы (76,86%). Также близкого значение достигло в группе растворителя и составило 96,37% ($p \leq 0,05$), что статистически значимо отличалось от группы К. Отличия значений экспериментальной группы и группы растворителя не были статистически значимыми.

$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 5 мкМ через 480 мин статистически значимо увеличил экспрессию GSK-3 β до 92,26% ($p \leq 0,05$) относительно К (при значении 38,15%). Растворитель за тот же отрезок времени статистически значимо увеличил значение экспрессии GSK-3 β до 93,72% ($p \leq 0,05$). Статистически значимых отличий между группой растворителя и группой препарата не было.

В концентрации 10 мкМ препарат $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ через 15 мин действия статистически достоверно увеличивал экспрессию GSK-3 β до 58,68% ($p \leq 0,01$) относительно контрольной группы при значении 29,2%. Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (860 мкл) статистически значимо относительно К повысил экспрессию до 59,63% ($p \leq 0,001$). Статистически значимых отличий между значениями экспериментальной группы действия препарата и группой растворителя при этом не наблюдалось.

Через 120 мин $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в концентрации 10 мкМ повышал экспрессию GSK-3 β до 92,27% относительно К, при значении 76,86%. Значение в группе растворителя составляло 90,57%. Отличия ни одной из данных групп не являлись достоверными.



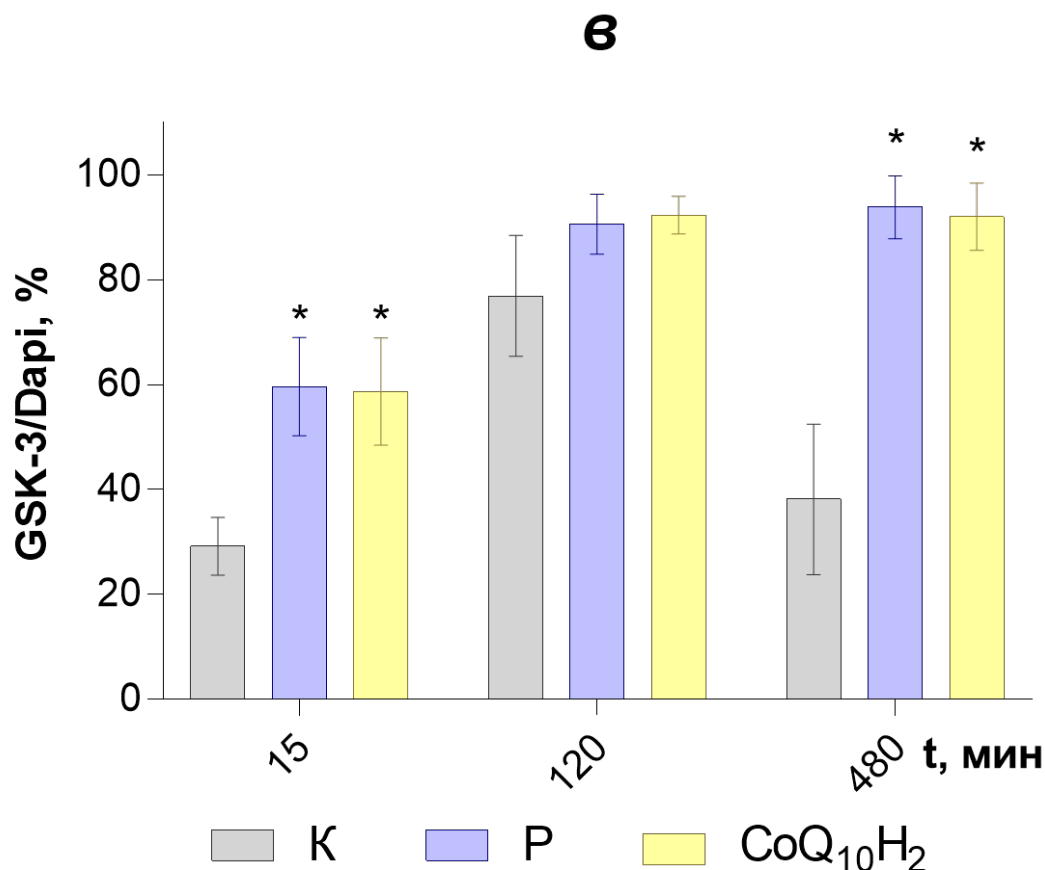


Рис. 11. Влияние CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1 (а), 5 (б) и 10 мкМ (в) на экспрессию белка GSK-3β в клетках эндотелия в модели ГЭБ в зависимости от времени инкубации. * – статистически значимые отличия от контроля (К); # – статистически значимые отличия от плацебо-контроля (Р); p≤0,05 (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

И наконец, через 480 мин действия препарата в той же концентрации 10 мкМ относительно К (38,15%), CoQ₁₀H₂ статистически значимо увеличил экспрессию GSK-3β до 92,01% (p≤0,05), при этом действие растворителя в тот же отрезок времени составляло 93,8% (p≤0,01). Статистически значимых отличий группа растворителя и группа CoQ₁₀H₂ между собой не имели.

GSK-3β (Киназа гликогенсинтазы-3) является серин/треониновой протеинкиназой, которая участвует в регуляции метаболизма гликогена

[108], а также регулирует пролиферацию, дифференцировку, внутриклеточный транспорт и клеточную гибель.

В настоящем диссертационном исследовании наблюдалось повышение экспрессии GSK-3 β 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 , практически во всех группах повлияв в сторону увеличения ее значения. Результаты повышения экспрессии GSK-3 β в модели ГЭБ не позволяют сделать заключения о влиянии CoQ₁₀H₂ на участие GSK-3 β в внутриклеточных процессах, поскольку действие растворителя также повышает экспрессию маркеров GSK-3 β .

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 [77].

Увеличение экспрессии GSK-3 β в диссертационном исследовании может быть обусловлено тем, что эксперимент проводился на клетках без патологической модели.

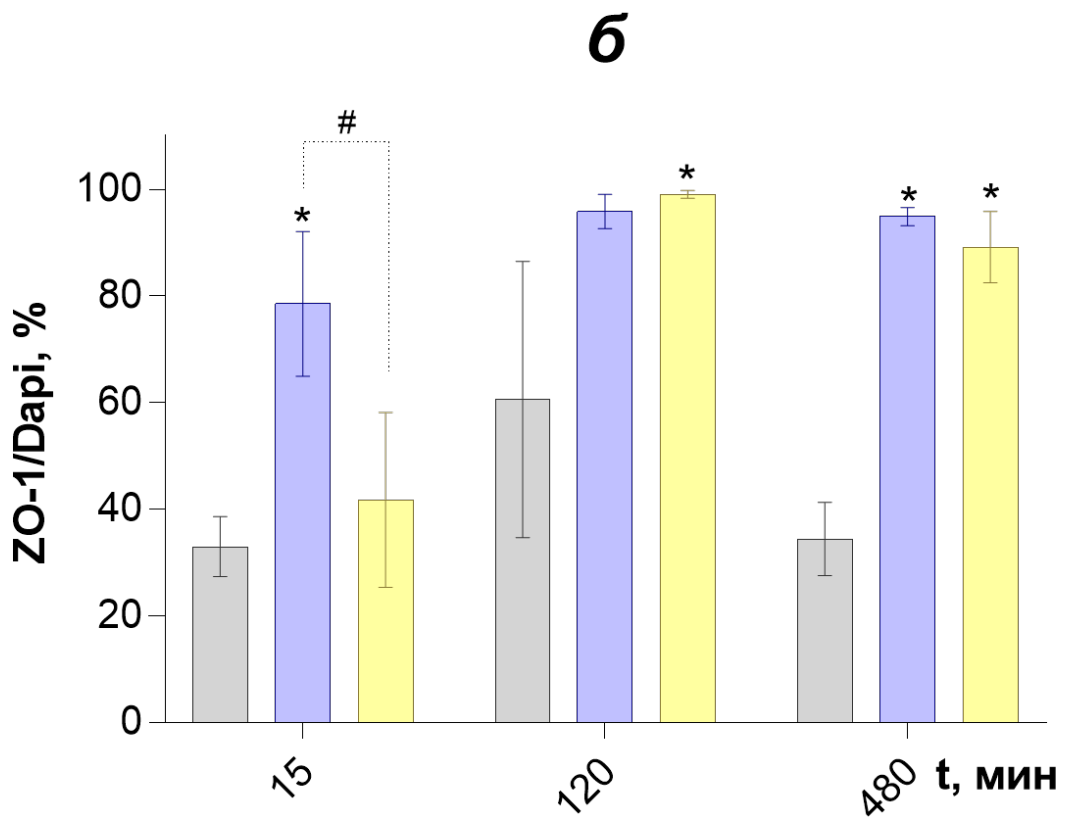
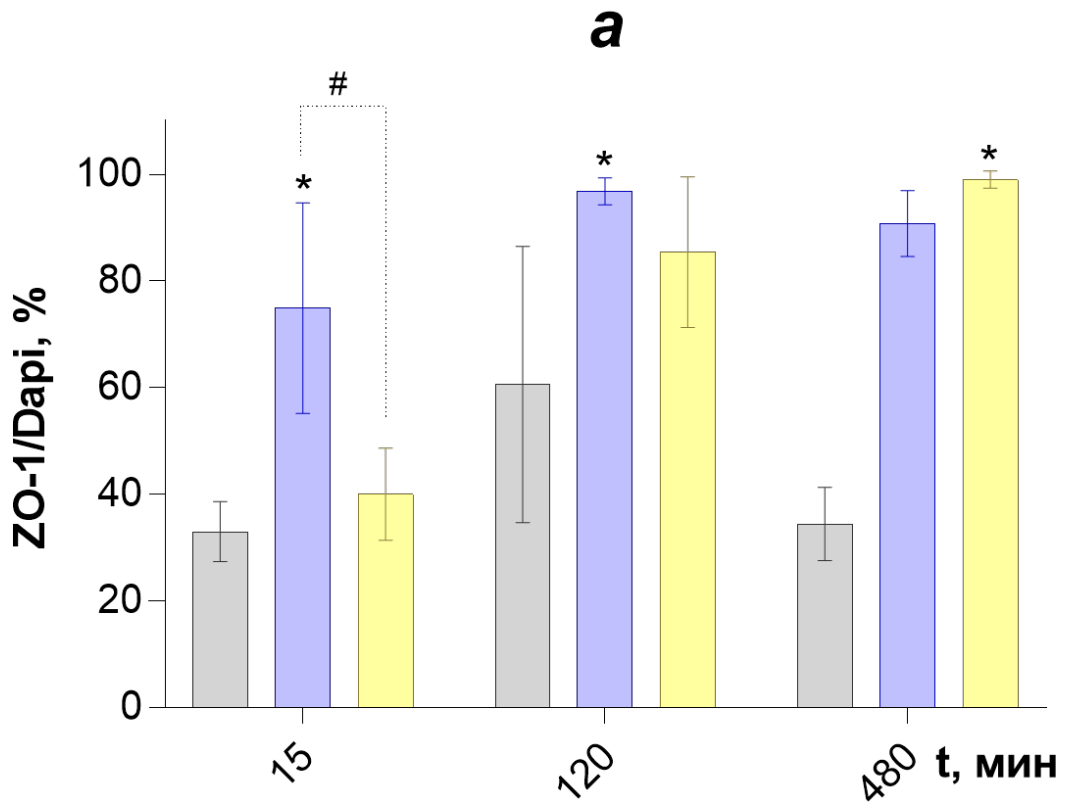
Оценка экспрессии ZO-1 на трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*

По результатам иммуногистохимического анализа, проводимого *in vitro* на трехклеточной модели ГЭБ, CoQ₁₀H₂ в концентрации 1 мкМ через 15 мин повышал экспрессию ZO-1 до 40% относительно контрольной группы (К), в которой значение составляло 32,99% (Рис. 12). Через то же время растворитель (Р) в эквивалентном объеме (86 мкл) статистически значимо относительно К повысил экспрессию до 74,91% ($p \leq 0,001$). При этом статистически значимые отличия наблюдались между значениями экспериментальной группы действия препарата и группой действия растворителя ($p \leq 0,05$).

Через 120 мин в той же концентрации 1 мкМ CoQ₁₀H₂ повышал экспрессию ZO-1 до 85,36% относительно К, равной 60,59%. Значение в группе растворителя при этом достигало 96,81% ($p \leq 0,01$), что статистически достоверно отличалось от К. Значения экспрессии экспериментальной группы и группы растворителя статистически значимо не отличались.

После 480 мин действия препарата в той же концентрации 1 мкМ, относительно К (где значение составляло 34,42%), CoQ₁₀H₂ статистически значимо увеличил экспрессию белка ZO-1 до 98,99% ($p \leq 0,001$), при этом действие растворителя в такой же отрезок времени было немного ниже и составляло 90,76%. Статистически значимых отличий группы растворителя не было ни с группой препарата, ни с контрольной группой.

Действие 5 мкМ CoQ₁₀H₂ в течение 15 мин на клетки эндотелия в трехклеточной модели ГЭБ увеличило значение экспрессии ZO-1 до 41,76% относительно К (32,99%). Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (430 мкл) статистически значимо относительно К повысил экспрессию до 78,51% ($p \leq 0,001$). При этом статистически значимые отличия наблюдались между значениями группы CoQ₁₀H₂ и группы растворителя ($p \leq 0,01$).



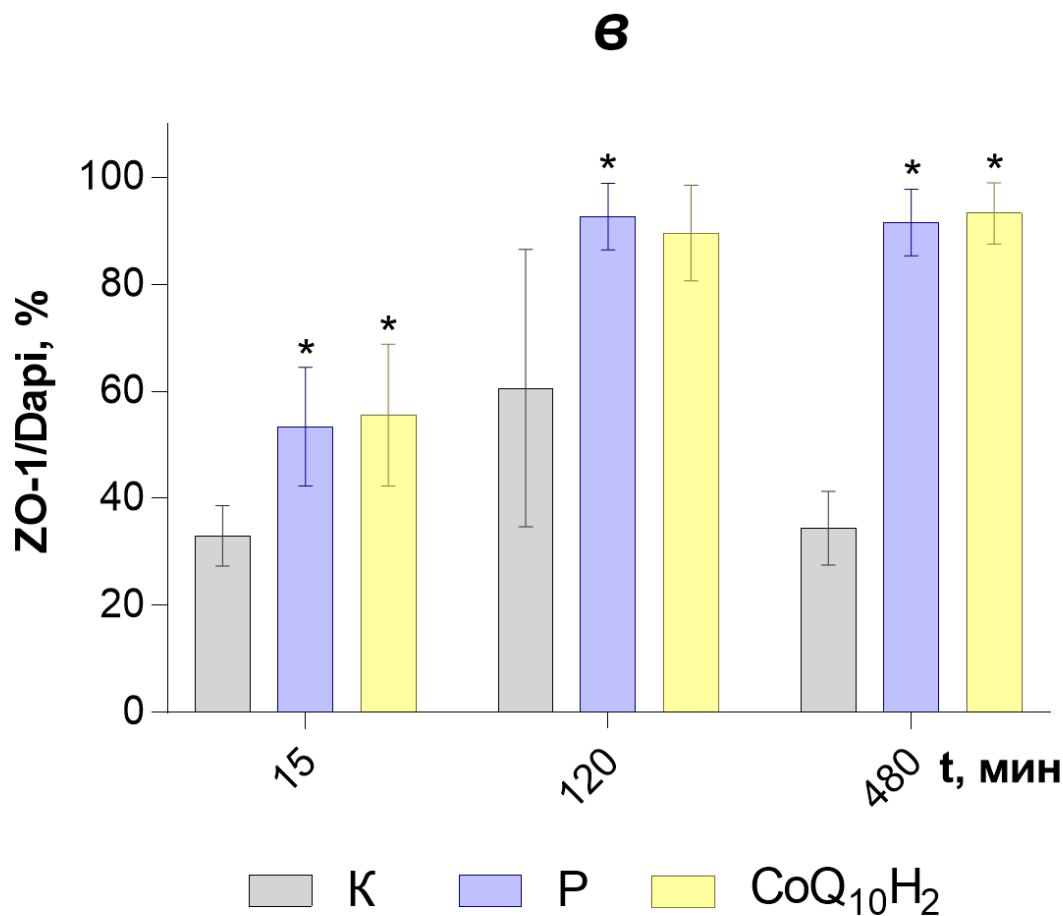


Рис. 12. Влияние CoQ₁₀H₂ в концентрациях 1 (а), 5 (б) и 10 мкМ (в) на экспрессию белка ZO-1 в клетках эндотелия в модели ГЭБ в зависимости от времени инкубации. * – статистически значимые отличия от контроля (К); # – статистически значимые отличия от плацебо-контроля (Р); $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Максимальное значение экспрессии за всю часть эксперимента наблюдалось через 120 мин, при влиянии CoQ₁₀H₂ в концентрации 5 мкМ, где он статистически значимо повышал экспрессию ZO-1 до 99,08% ($p \leq 0,001$) относительно контрольной группы, (60,59%). Значение в группе растворителя при этом было равно 95,82%, что не отличалось статистически значимо от К. Отличия значений экспериментальной группа и группы растворителя также не были статистически значимыми.

CoQ₁₀H₂ в той же концентрации через 480 мин статистически значимо увеличил экспрессию белка ZO-1 до 89,11% ($p \leq 0,05$) относительно К (при значении 34,42%). Растворитель за тот же отрезок времени статистически значимо увеличил значение экспрессии ZO-1 до 94,9% ($p \leq 0,01$). Статистически значимых отличий между группой растворителя и группой препарата не было.

В концентрации 10 мкМ препарат CoQ₁₀H₂ через 15 мин действия статистически значимо увеличивал экспрессию белка ZO-1 до 55,57% ($p \leq 0,01$) относительно контрольной группы при значении 32,99%. Через то же время растворитель в эквивалентном объеме (860 мкл) статистически значимо относительно К повысил экспрессию до 53,41 % ($p \leq 0,001$). При этом статистически значимых отличий между значениями экспериментальной группы действия препарата и группой действия растворителя не было.

Через 120 мин в концентрации 10 мкМ CoQ₁₀H₂ повышал экспрессию ZO-1 до 89,52% относительно К, при значении 60,59%. Значение в группе растворителя при этом достигло 92,64% ($p \leq 0,05$), что статистически достоверно отличалось от К. Значения экспериментальной группы и группы растворителя статистически значимо не отличались.

И наконец, через 480 мин действия CoQ₁₀H₂ в концентрации 10 мкМ, относительно К (34,42%) статистически значимо увеличил экспрессию белка ZO-1 до 93,26% ($p \leq 0,01$), при этом действие растворителя в такой же отрезок времени было немного ниже и составляло 91,52% ($p \leq 0,05$). Статистически значимых отличий группа растворителя и группа CoQ₁₀H₂ между собой не имели.

ZO-1-белок (*Zonula occludens-1*) является белком плотных адгезионных контактов. Белок принадлежит к семейству белков *zona occludens*, которые являются белками, ассоциированными с плотными контактами [75]. Группа периферически связанных каркасных белков, к которой принадлежит ZO-1,

способна организовывать трансмембранные белки и связывать их с другими цитоплазматическими белками и актиновым микрофиламентом [43, 72].

В некоторых исследованиях также показано, что за счет регуляции ZO-1 можно добиться защиты клеток от окислительного стресса [76].

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 [68, 88].

Помимо этого, есть исследования, демонстрирующие, что взаимодействие с ZO-1 позволяет окклюдину опосредовать адгезивные функции, что является косвенным доказательством укрепления барьерных свойств. При сверхэкспрессии в фибробластах, содержащих ZO-1 адгезивные соединения, наблюдалась повышенная Ca^{2+} -независимая адгезия [132], при этом при анализе экспрессии в L-фибробластах, лишенных эндогенных адгезивных соединений на основе кадгерина и ZO-1, была измерена низкая адгезивность [73].

Диссертационное исследование показало повышение экспрессии ZO-1 в экспериментальных группах относительно контрольных значений. 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). Растворитель оказал действие на экспрессию ZO-1, практически во всех группах, повышая ее значения. Результаты повышения экспрессии ZO-1 в модели ГЭБ не позволяют сделать заключения о влиянии $CoQ_{10}H_2$ на функции белка плотных адгезионных контактов, поскольку действие растворителя также повышает экспрессию маркеров ZO-1.

Редокс-статус CoQ_{10} в головном мозге крыс после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 30 мг/кг

Для оценки редокс-статуса в исследование было включено 25 животных. Редокс-статус коэнзима Q_{10} (соотношение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ /общее содержание CoQ_{10}) измерялся в мозге и плазме.

Редокс-статус в мозге крыс поддерживался относительно неизменным на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 14): до введения, на фоне повышенных тканевых уровней (96 часов) и после возвращения к исходным (к концу 8 суток). Эти значения также измерялись в плазме (Рис. 13) и отличались между собой. Различия редокс-статуса CoQ_{10} в плазме и мозге свидетельствуют об окислении убихинола в процессе поступления из крови в ткани органов до уровня эндогенного редокс-баланса вследствие включения препарата в локальные окислительно-восстановительные процессы. До введения препарата значение в мозге составляло $66 \pm 7,6$ %, а через 2; 24; 96 и 192 ч после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ значения редокс-статуса были равны $69 \pm 6,7$; $68 \pm 2,7$; $69 \pm 4,7$ и $66 \pm 5,1$ %, соответственно. В плазме крови после однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 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 ± 12 и $32 \pm 6,2$ %, соответственно.

Полученные фоновые значения редокс-статуса коэнзима Q_{10} в тканях крысы до введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ отличаются от немногочисленных данных [22, 124, 142] имеющихся в литературе. По полученным данным доля восстановленного коэнзима Q_{10} в головном мозге значительно выше, что может быть обусловлено использованным режимом анализа «on-line», при котором образцы перед анализом не подвергались заморозке. В исследовании Tatsuta [125] образцы мозга мышей также не замораживали, и редокс-статус CoQ_{10} (60%) практически совпал с полученным результатом диссертационного исследования ($66 \pm 7,6$ %).

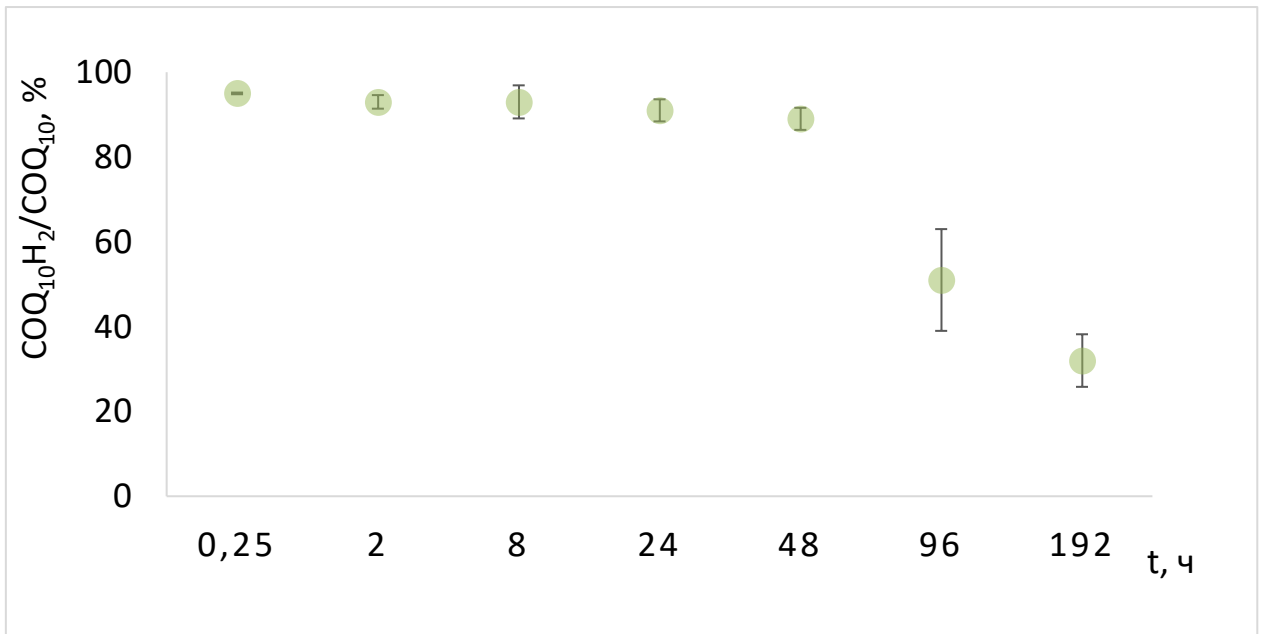


Рис. 13. Редокс-статус (б) CoQ₁₀ в плазме крови крысы в различные временные интервалы после внутривенного введения CoQ₁₀H₂ (30 мг/кг).

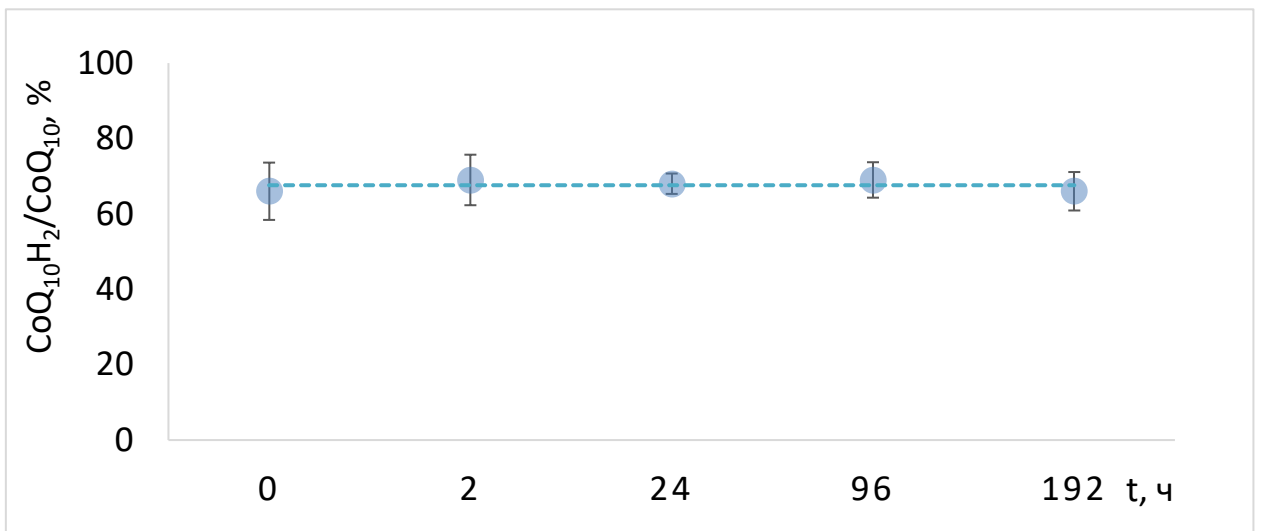


Рис. 14. Редокс-статус (б) коэнзима Q₁₀ в головном мозге крысы до и в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола (30 мг/кг). Приведена линия тренда.

Полученные результаты доказывают способность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ при внутривенном введении быстро и эффективно повышать антиоксидантный резерв тканей, что может найти применение в ургентной терапии ишемии головного мозга.

Результаты опубликованы в совместных работах с соавторами [5, 117].

Иммуногистохимический анализ срезов мозга крыс после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ в дозе 30 мг/кг

Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки CD31 в срезах разных участков мозга крыс

По результатам иммуногистохимического анализа в энторинальной коре срезов головного мозга крыс через 2 ч после введения CoQ₁₀H₂ наблюдалось статистически значимое повышение количества CD31-иммунопозитивных (CD31+) клеток с 19,11% до 24,82% ($p \leq 0,05$) (Рис. 15). Далее через 24 ч значение сохраняло статистически значимое отличие от контрольной группы (0) и составило 26% ($p \leq 0,05$). Через 96 ч значение снизилось до 17,83%, что не имело статистически достоверных отличий от контрольной группы, но составило статистически значимые отличия группы 96 ч от показателей экспрессии белка CD31 в экспериментальных группах 2 ч ($p \leq 0,05$) и 24 ч ($p \leq 0,05$). По прошествии 192 ч экспрессия CD31 была равна 23,02%, при этом статистически значимых отличий от группы контроля не было. Также не наблюдалось статистически достоверных отличий между другими экспериментальными группами.

В гиппокампе экспрессия белка CD31 немного повышалась через 2 ч до 22,93% по сравнению с контрольной группой (0) равной 19,07%. Через 24 и 96 ч значение было равно 19,76 и 20,47%, соответственно, а через 192 ч снизилось до 16,34%. Статистически значимых отличий ни в одной из групп не наблюдалось.

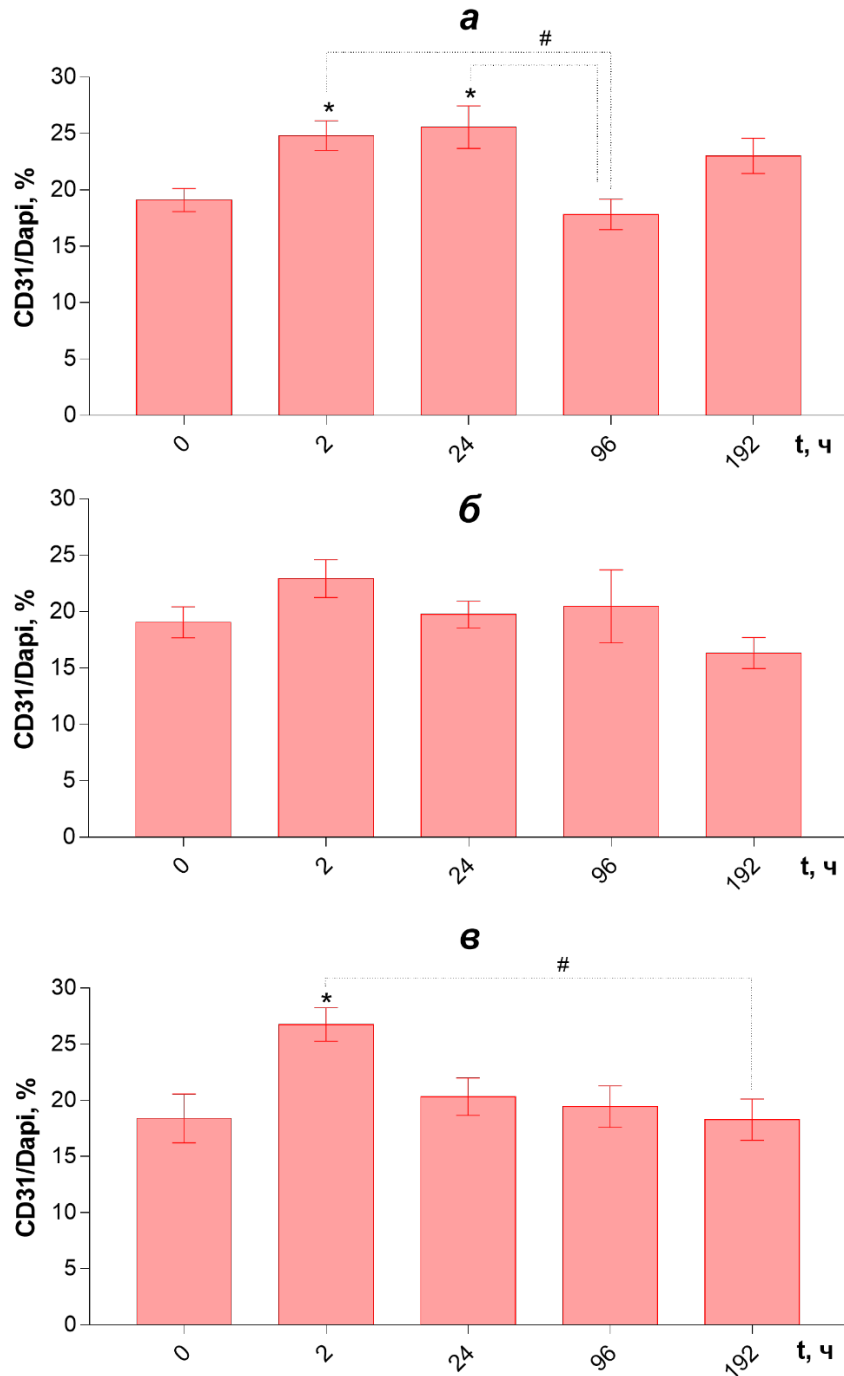


Рис. 15. Влияние однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на количество клеток, несущих антиген (процент клеток соответствующего антигена) CD31 в структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в). * – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия между группами; $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

В миндалинах головного мозга крыс через 2 ч после введения препарата значение экспрессии CD31 с 18,39% статистически достоверно поднялось до 26,75% ($p \leq 0,05$). Затем значение экспрессии стало снижаться и через 24, 96, 192 ч составило 20,32, 19,44 и 18,27%, соответственно, что статистически значимых отличий от контрольной группы не имело. Между экспериментальными группами (2 ч и 192 ч) наблюдалось статистически значимое отличие значений экспрессии CD31 ($p \leq 0,05$). Статистически значимых отличий между другими экспериментальными группами не наблюдалось.

Молекула CD31 (PECAM-1) участвует в регуляции ангиогенеза, воспаления и активации клеточной адгезии и рассматривается как прогностический маркер ангиогенеза [28]. Таким образом, можно выдвинуть предположение о том, что в энторинальной коре и миндалинах при действии убихинола инициируются процессы неоангиогенеза, ассоциированные с барьерогенезом.

Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки Pgr в срезах разных участков мозга крыс

По результатам иммуногистохимического анализа в энторинальной коре срезов головного мозга крыс через 2 ч после введения CoQ₁₀H₂ наблюдалось небольшое снижение значения экспрессии Pgr с 30,43% до 27,21% (Рис.16). Далее через 24 ч и 96 ч значение увеличилось до 33,99 и 40,14%, соответственно, но при этом статистически не отличалось от контроля (0). По прошествии 192 ч экспрессия Pgr была равна 35,77%. Статистически значимых отличий остальных групп от группы контроля не было. Между экспериментальными группами (2 ч и 96 ч) наблюдалось статистически значимое отличие значений экспрессии Pgr ($p \leq 0,05$).

В гиппокампе экспрессия Pgr повышалась через 2 ч и 24 ч до 27,08 и 27,17%, соответственно, по сравнению с контрольной группой (0) равной

20,95%. Через 96 ч значение статистически значимо относительно контрольной группы поднялось до 34,05% ($p \leq 0,05$). Через 192 ч значение было равно 25,54%. Статистически значимых отличий между экспериментальными группами при этом не было.

В миндалине головного мозга крыс через 2 ч после введения препарата значение экспрессии Pgp с 29,58% поднялось до 30,63%, а затем через 24 ч достигло 32,82%. Через 96 ч значение опустилось ниже контрольного до 28,06%. И через 192 ч статистически значимо снизилось до 20,96% относительно контрольной группы ($p \leq 0,05$). Между экспериментальными группами (24 ч и 192 ч) наблюдалось статистически значимое отличие значений экспрессии Pgp ($p \leq 0,01$). Статистически значимых отличий между другими экспериментальными группами не наблюдалось.

Известно, что Pgp является мембранным эффлюксным АТФ-зависимым белком-транспортером с широким спектром эндогенных и экзогенных субстратов. Он выводит из клеток ксенобиотики и эндогенные метаболиты [118]. Тот факт, что увеличение экспрессии Pgp после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 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 (Рис. 19).

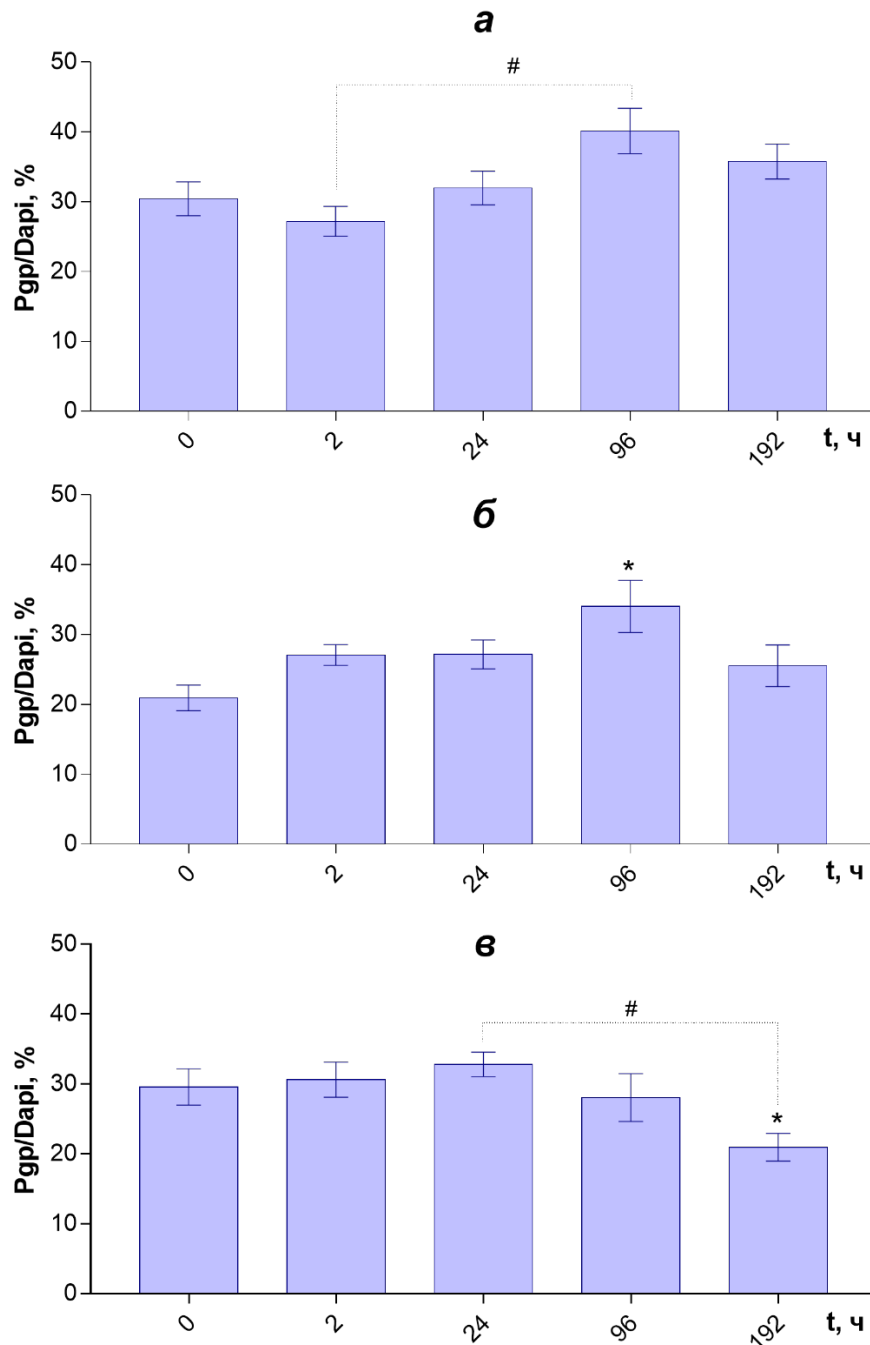


Рис. 16. Влияние однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на количество клеток, несущих антиген (процент клеток соответствующего антигена) Pgr в структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в). * – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия между группами; $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

Следует упомянуть, что Pgp активен в отношении широкого спектра субстратов: от небольших молекул, таких, как органические катионы, углеводы, аминокислоты и некоторые антибиотики до макромолекул, таких как полисахариды и белки [83, 144]. Известно, что низкая биодоступность CoQ₁₀H₂ частично связана с его взаимодействием с Pgp, участвующим в выведении препарата [33, 53]. Поскольку в работе было установлено, что через 96 ч после введения CoQ₁₀H₂ экспрессия Pgp увеличивается в гиппокампе, можно предположить, что изменение экспрессии Pgp имеет индуцибельный характер.

Влияние CoQ₁₀H₂ на эндотелиальные белки CLDN5 в срезах разных участков мозга крыс

В результате иммуногистохимического анализа выявлено, что через 2 ч после введения CoQ₁₀H₂, в энторинальной коре срезов головного мозга наблюдалось повышение экспрессии белка CLDN5 с 22,33% до 23,27% (Рис.17). Через 24 ч значение увеличилось до 29,40%, а через 96 и 192 ч повышение достигло статистически значимых отличий от значения контрольной группы (0) и составляло 34,52% ($p \leq 0,05$) и 34,85% ($p \leq 0,05$), соответственно. Статистически значимых отличий между экспериментальными группами не наблюдалось.

В гиппокампе через 2 ч экспрессия CLDN5 снижалась до 18,56% относительно контрольной группы (0) равной 26,52%. Через 24 и 96 ч значения поднялись до 24,74 и 32,37%, соответственно. По прошествии 192 ч значение экспрессии белка снова снизилось и составило 14,55% ($p \leq 0,05$), что статистически достоверно отличалось от контрольной группы. Между экспериментальными группами (96 и 192 ч) наблюдалось статистически значимое отличие значений экспрессии CLDN5 ($p \leq 0,01$). Статистически значимых отличий между другими экспериментальными группами при этом не было.

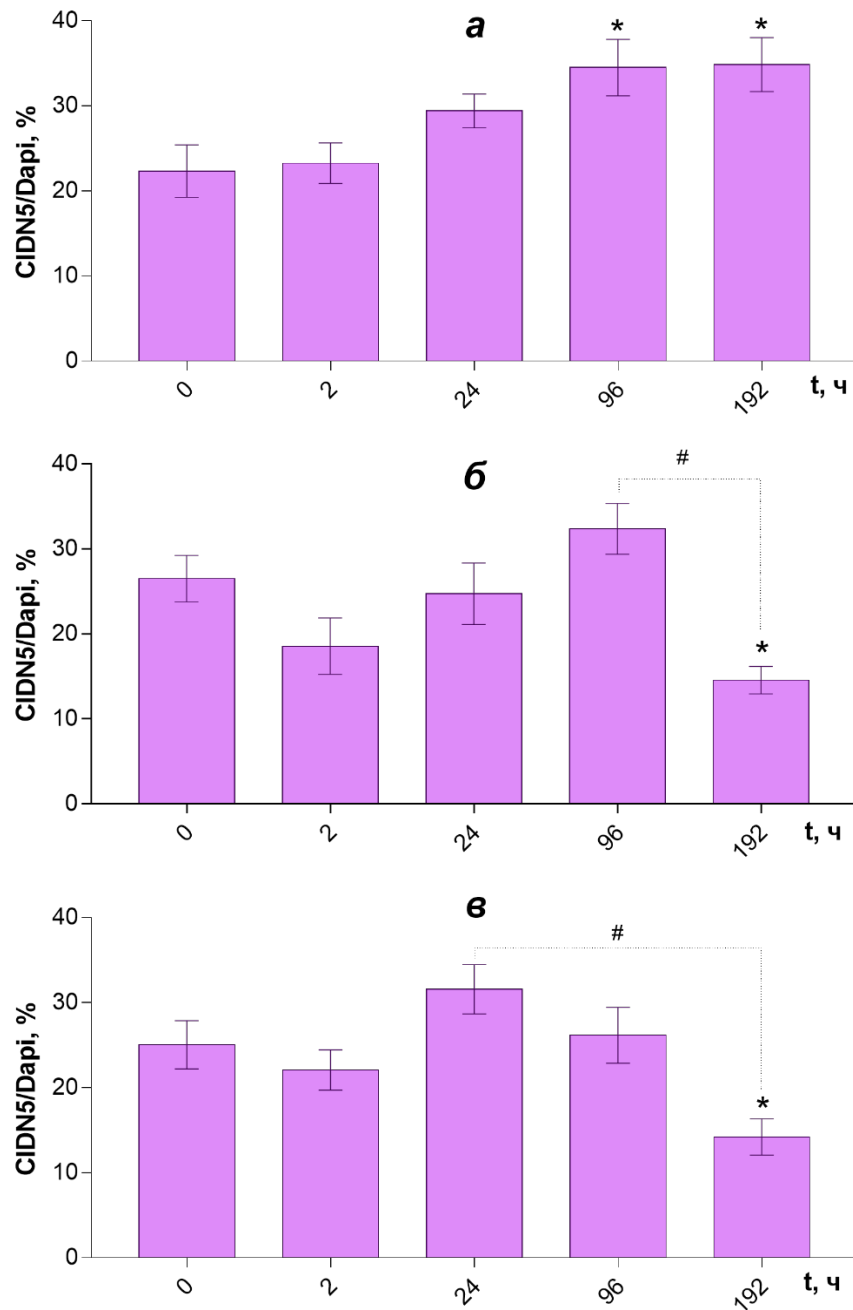


Рис. 17. Влияние однократного внутривенного введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на количество клеток, несущих антиген (процент клеток соответствующего антигена) CLDN5 в структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (*а*), гиппокампе (*б*), миндалине (*в*). * – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия между группами; $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

В миндалине головного мозга крыс после введения препарата значение экспрессии CLDN5 с 25,06% сначала снизилось через 2 ч до 22,08%, а затем через 24 ч поднялась до 31,59%. Через 96 ч значение снизилось, но все еще было немного выше контрольного и составило 26,18%. Через 192 ч значение экспрессии достигло 14,23%, что статистически достоверно отличалось от контрольной группы ($p \leq 0,05$). Между экспериментальными группами (24 и 192 ч) также наблюдалось статистически значимое отличие значений экспрессии белка CLDN5 ($p \leq 0,001$). Статистически значимых отличий между остальными экспериментальными группами не было.

Важность маркера CLDN5 для контроля проницаемости эндотелиальных клеток была продемонстрирована в экспериментах на мышях с дефицитом клаудина-5. В мозге этих мышей развитие и морфология кровеносных сосудов не изменялись, не было кровотечений или отеков. Однако эксперименты с трейсером и магнитно-резонансная томография показали, что у этих мышей избирательно затрагивалась проницаемость ГЭБ для малых молекул [98]. В то время, как в энторинальной коре $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ инициируются процессы неоангиогенеза, ассоциированные с барьерогенезом, что уже обсуждалось выше, в гиппокампе и миндалине головного мозга в отдаленные сроки после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ можно прогнозировать снижение структурной целостности ГЭБ.

Влияние $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на экспрессию GSK-3 β в срезах разных участков мозга крыс

По результатам иммуногистохимического анализа достоверных отличий изменений экспрессии GSK-3 β в срезах головного мозга по сравнению с контролем не было (Рис. 18).

В энторинальной коре через 2 ч после введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ наблюдалось небольшое увеличение экспрессии GSK-3 β с 21,13% до 21,98%. Далее через 24 ч и 96 ч значение снизилось до 18,98 и 15,53%, соответственно. По

по прошествии 192 ч экспрессия GSK-3 β была равна 22,36%. Статистически значимых отличий группы между собой также не имели.

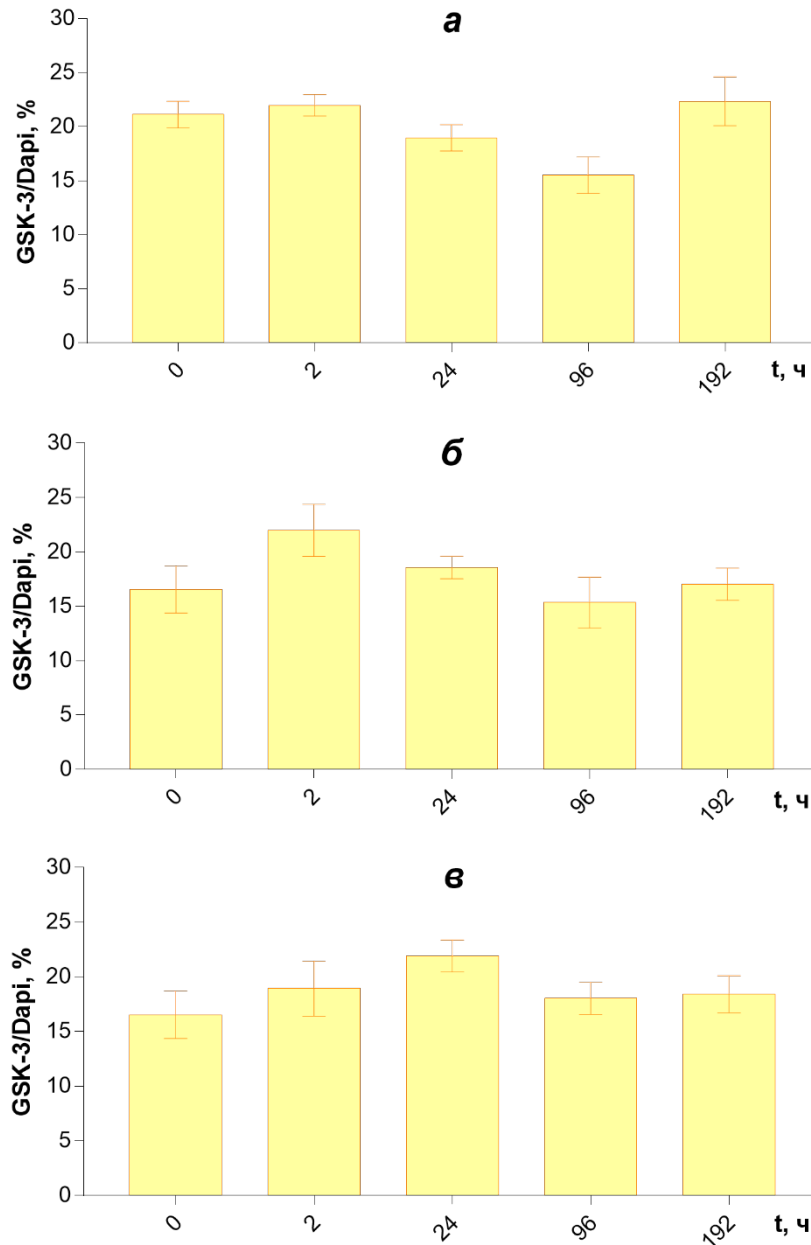


Рис. 18. Влияние однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ на количество клеток, несущих антиген (процент клеток соответствующего антигена) GSK-3 β в структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в).

В гиппокампе с 16,56 экспрессия GSK-3 β увеличилась за 2 ч до 21,99 %, далее значения снижались и достигли через 24 ч 18,58%, через 96 ч 15,35%, а через 192 ч немного увеличилось до 17,04%. Статистически значимых отличий между группами при этом не было.

В миндалине головного мозга крыс через 2 ч после введения препарата значение экспрессии GSK-3 β с 16,52% увеличилось до 18,93%, а затем через 24 ч достигло 21,91%. Через 96 ч и 192 ч значения были равны 18,03 и 18,41%, соответственно. Статистически значимых отличий между группами также не было.

GSK-3 β участвует в регуляции метаболизма гликогена, регулирует пролиферацию, дифференцировку, внутриклеточный транспорт и клеточную гибель [108].

Исследования на моделях крыс, подвергшихся церебральной ишемии/реперфузии показали, что применение CoQ₁₀ до возникновения ишемического поражения способствует снижению экспрессии GSK-3 β в гиппокампе [126]. Также результаты исследования на модели черепно-мозговой травмы *in vivo* на мышах демонстрировали, что действие CoQ₁₀ снижает GSK-3 β в нейронах [77].

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.

Апоптоз в ткани головного мозга крыс после однократного внутривенного введения CoQ₁₀H₂ (TUNEL-анализ)

По результатам TUNEL-анализа, позволяющему оценить апоптоз в клетках головного мозга (Рис. 20), выявлено, что через 2 ч после введения CoQ₁₀H₂ в энторинальной коре наблюдалось снижение апоптоза с 4,65% до 3,78% (Рис. 19). Через 24 ч значение продолжало снижаться и составило 2,84%, а через 96 и 192 ч снижение достигло статистически значимых отличий от значения контрольной группы (0) и составляло 2,38% ($p \leq 0,01$) и 2,39% ($p \leq 0,05$), соответственно. Статистически значимых отличий между экспериментальными группами не наблюдалось.

В гиппокампе наблюдалось статистически достоверное снижение апоптоза в зависимости от длительности действия CoQ₁₀H₂ относительно контрольной группы (0), равной 5,15%. Через 2, 24, 96 и 192 ч значения апоптоза снижались до 2,6% ($p \leq 0,05$), 2,34% ($p \leq 0,05$), 1,76% ($p \leq 0,0001$) и 1,65% ($p \leq 0,0001$), соответственно. Статистически значимых отличий между экспериментальными группами при этом не было.

В миндалинах головного мозга крыс после введения препарата значения апоптоза по сравнению с контрольной группой, составлявшей 3,32%, через 2, 24 и 96 ч составили 3,31, 3,62 и 2,28%, соответственно. Через 192 ч значение экспрессии достигло 1,76% ($p \leq 0,05$), что статистически достоверно отличалось от контрольной группы. Между экспериментальными группами (24 и 192 ч) также наблюдалось статистически значимое отличие значений апоптоза ($p \leq 0,05$). Статистически значимых отличий между остальными экспериментальными группами не было.

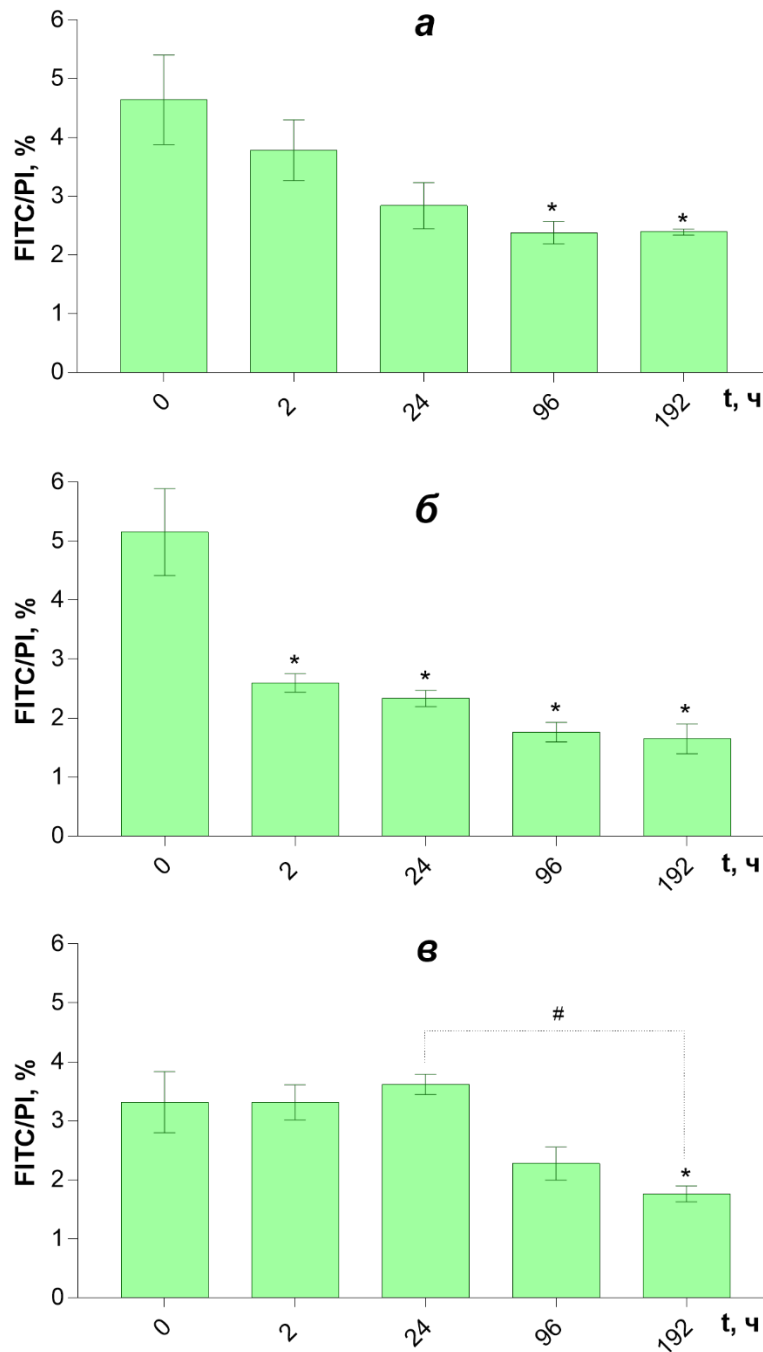


Рис. 19. Влияние CoQ₁₀H₂ на уровень апоптоза (процент клеток соответствующего антигена FITC) в различных структурах головного мозга крыс: энторинальной коре (а), гиппокампе (б), миндалине (в).

* – статистически значимые отличия от контроля (0); # – статистически значимые отличия между группами; $p \leq 0,05$ (p – уровень значимости, тест Краскела–Уоллиса)

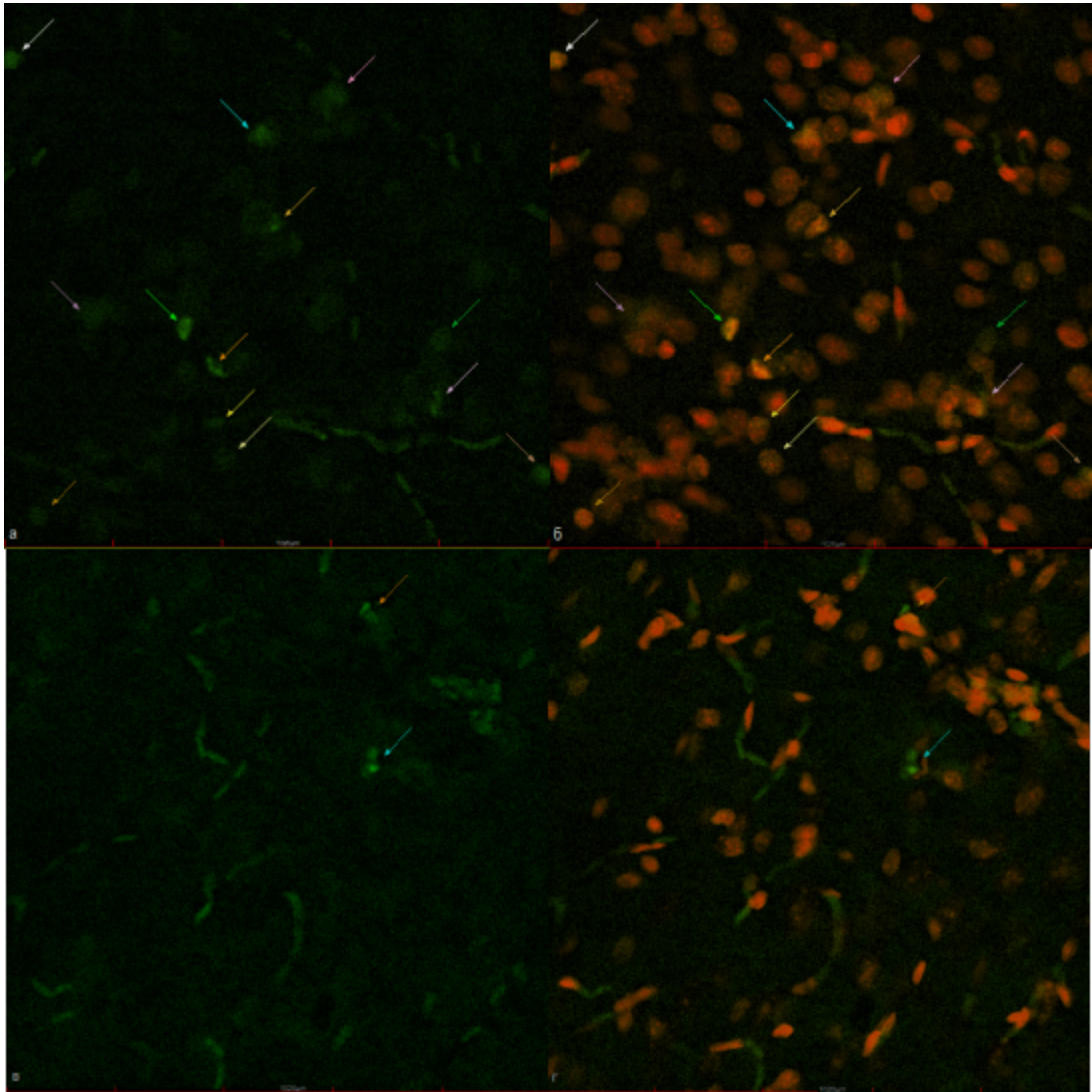


Рис. 20. Апоптоз в клетках энторинальной коры головного мозга, зарегистрированный с использованием метода TUNEL. *а* – клетки контрольной группы (0), в которых произошел апоптоз, окрашенные FITC; *б* – эти же клетки с ядрами, окрашенными PI (совмещение с изображением *а*). *в* – клетки через 96 ч после однократного внутривенного введения убихинола в дозе 30 мг/кг, окрашенные FITC; *г* – эти же клетки с ядрами, окрашенными PI (совмещение с изображением *в*). Стрелками показаны клетки в апоптозе. Увел. об.: 60×.

По результатам исследования Sun J. и соавторов, в котором на мышах оценили действие убихинола при митохондриальной дисфункции, вызванной диабетической нефропатией, было установлено, что препарат снижает

уровень апоптоза, который повышается при этой патологии за счет митохондриальных аномалий, таких как дефектная митофагия, образование митохондриальных АФК и снижение митохондриального мембранного потенциала. Убихинол, как эффективный антиоксидант в митохондриях, оказывал благотворное влияние на диабетическую нефропатию через митофагию, восстанавливая передачу сигналов Nrf2/ARE [122].

Авторы другой работы, в которой изучали защитный эффект коэнзима Q₁₀ против высокого, индуцированного глюкозой, окислительного стресса в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC), сделали вывод, что коэнзим Q₁₀ предотвращает апоптоз, вызванный АФК, путем ингибирования митохондриально-зависимого пути через каспазу 3 [130]. Более подробное исследование Tsai и соавторов установило механизм снижения апоптоза, который включает подавление каспазы 3, усиление Bcl-2 и увеличение мембранного потенциала митохондрий. Кроме того, действие CoQ₁₀ на эндотелиальные клетки-предшественники, предварительно обработанные глюкозой в высокой дозе, снижало в этих клетках количество АФК, повышало активность eNOS/Akt и увеличивала экспрессию гемоксигеназы-1 [129].

В работе, в которой эндотелиальные клетки HUVEC обрабатывали пероксидом водорода, изучали защитный эффект убихинола против старения, окислительного повреждения и снижения активности клеточных функций. Сообщается, что убихинол заметно снижает количество β-галактозидаза-позитивных клеток, связанных со старением, и ингибирует экспрессию ассоциированных со старением секреторных фенотип-ассоциированных генов в клетках HUVEC, подавляя образование внутриклеточных АФК [56]. Убихинол предотвращал апоптоз и снижение митохондриальной функции, задерживая старение сосудов.

Полученные данные о снижении интенсивности апоптоза 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 [14]. А заболеваниями, опосредованными ускорением апоптоза, являются СПИД, болезни Альцгеймера и Паркинсона, анемия, инфаркты и инсульты, некоторые заболевания печени и почек, лучевая болезнь [3, 14].

Результаты, полученные в экспериментах *in vivo*, опубликованы в совместных работах с соавторами [19].

ГЛАВА IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе проведены исследования действия препаратов коэнзима Q₁₀ в его окисленной и восстановленной формах на ГЭБ. Исследования состояли из нескольких частей и проводились в условиях *in vitro*, включающих исследование влияния препаратов CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ на клетки сформированной модели ГЭБ. А также в условиях *in vivo*, направленных на изучение фармакокинетики препарата после его однократного внутривенного введения в дозе 30 мг/кг и иммуногистохимической оценки экспрессии белков маркеров эндотелиальных компонентов ГЭБ и апоптоза клеток головного мозга.

В условиях *in vitro* оценены целостность и проницаемость ГЭБ с помощью измерения ТЭС, а также за счет экспрессии маркера ZO-1 (в частности, парацеллюлярная проницаемость), влияние на апоптоз и продукцию АФК при оценке экспрессии Rac-1 и метаболический статус клеток при оценке GSK-3 β (Таблица 1).

В экспериментах *in vivo* проанализирован редокс-статус CoQ₁₀H₂ и оценены целостность ГЭБ за счет экспрессии маркера CD31, его трансцеллюлярная проницаемость при оценке экспрессии Pgp и парацеллюлярная проницаемость при оценке экспрессии CLDN5, за счет экспрессии маркера GSK-3 β метаболический статус клеток ГЭБ, а также влияние на апоптоз с помощью TUNEL-анализа (Таблица 2).

Исследование препаратов CoQ₁₀ и CoQ₁₀H₂ в условиях *in vitro* и *in vivo* показали влияние на клетки церебрального эндотелия в сформированной модели ГЭБ, а также действие восстановленной формы после ее внутривенного введения на различные структуры головного мозга.

Таблица 1. 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)

Таблица 2. 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 ТЭС является интегральным показателем целостности ГЭБ [121], полученные данные, подтверждают изменения проницаемости ГЭБ при воздействии CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. При этом действие $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ является дозозависимым.

Высокие уровни экспрессии Rac-1 клетками ГЭБ, ассоциированы с повреждением и повышением проницаемости ГЭБ, усилением апоптоза клеток и митохондриальной недостаточностью [62]. Таким образом, CoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, 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 $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (приблизительно в 31,5 раза относительно контроля). А максимально длительным (120 минут) и сильным эффект снижения экспрессии Rac-1 был при действии 1 мкМ CoQ_{10} (приблизительно в 22 раза по сравнению с контролем). В работе, описывающей действие $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на ооциты млекопитающих в модели постовуляторного старения *in vitro*, наличие максимально выраженного эффекта предотвращения окислительного стресса было достигнуто при концентрации 100 мкМ [99].

Значения редокс-статуса CoQ_{10} в тканях крысы до введения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ отличаются от литературных данных [22, 124, 142]. По полученным данным, доля восстановленного CoQ_{10} в головном мозге значительно выше, что может быть обусловлено использованным режимом анализа «on-line». В исследовании Tatsuta [125] образцы мозга мышей также не замораживали перед анализом, и редокс-статус CoQ_{10} (60%) практически совпал с полученным результатом ($66 \pm 7,6\%$).

Поскольку CD31 рассматривается как прогностический маркер ангиогенеза [28], 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 [98], 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.

Как известно, низкая биодоступность CoQ₁₀H₂ частично связана с его взаимодействием с Pgr, участвующим в выведении препарата [33, 53] и увеличение экспрессии Pgr в гиппокампе через 96 ч говорит о том, что изменение экспрессии маркера имеет индуцибельный характер.

Полученные результаты дополняют и расширяют имеющиеся сведения о коэнзиме Q₁₀, в частности, о его восстановленной форме CoQ₁₀H₂, предназначенной для внутривенного введения. Эти данные помогут оценить действие коэнзима Q₁₀ на структуры головного мозга, в том числе на ГЭБ и приблизиться к пониманию механизма действия препарата и его проникновения через ГЭБ.

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 $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 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 $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$.

4. $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ повышает количество CD31^+ -клеток в миндалинах и энторинальной коре, увеличивает количество Pgr^+ -клеток с маркером в гиппокампе и снижает в миндалинах, а также повышает количество CLDN5^+ -клеток в энторинальной коре, но снижает в гиппокампе и миндалинах и не влияет на $\text{GSK-3}\beta$. Увеличение количества CD31^+ -клеток в коре, наблюдающееся через 2-24 ч действия $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, сопровождалось последующим увеличением количества CLDN5^+ -клеток в период 96-192 ч, что говорит о признаках интенсификации ангиогенеза. При этом в миндалинах увеличение CD31^+ -клеток сопровождалось отсроченным снижением CLDN5^+ -клеток, а в гиппокампе было лишь снижение CLDN5^+ -клеток, что подтверждает регион-специфическое действие $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$.
5. $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в дозе 30 мг/кг снижает апоптоз в коре, гиппокампе и миндалинах. 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 $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 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
АФК	Активная форма кислорода
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГТФ	Гуанозинтрифосфат
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
К	Контроль
НАДН	Восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида
Р	Растворитель (плацебо раствор)
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СПИД	Синдром приобретенного иммунодефицита
ТЭС	Трансэндотелиальное электрическое сопротивление
ЦНС	Центральная нервная система
ABC	ATP binding cassette
Akt	Protein kinase B/PKB
ARE	Antioxidant response element
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD31 (PECAM-1)	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (молекула адгезии тромбоцитов / эндотелиальных клеток 1)
CoQ ₁₀	Коэнзим Q ₁₀ , убихинон
CoQ ₁₀ H ₂	Убихинол
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)

eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (Эндотелиальная синтаза оксида азота)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (флюоресцеинизотиоционат)
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta (Киназа гликогенсинтазы-3)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (эндотелиальные клетки пупочной вены человека)
PI	Пропидий йодид
Nrf2	Nuclear erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphate buffered saline
Pgp	P-Glycoprotein/Abcb1 (P-гликопротеин)
PI-4-P5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
SD	Standard Deviation (стандартное отклонение)
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase (терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза)
TUNEL	TdT dUTP Nick End Labeling
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
ZO-1	Zonula occludens (белки плотных контактов)

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Каленикова Е.И. Фармакокинетика и тканевое распределение коэнзима Q10 у при внутривенном введении в окисленной и восстановленной формах [Текст] / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.Н. Оболенская, **Н.С. Шаповал**, В.Г. Макаров, О.С. Медведев // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55. – № 7. – С. 3-7.
2. **Шаповал Н.С.** Влияние убихинола на состояние церебральных эндотелиоцитов в различных структурах головного мозга крыс [Текст] / **Н.С. Шаповал**, Н.А. Малиновская, А.В. Моргун, А.Б. Салмина, О.Н. Оболенская, Н.А. Медведева, О.С. Медведев // Цитология. – 2020. – Т. 62. – №12. – С. 894-902. **Shapoval N.S.** The effect of ubiquinol on cerebral endothelial cells in different regions of rat brain [Text] / **N.S. Shapoval**, N.A. Malinovskaya, A.V. Morgun, A.B. Salmina, O.N. Obolenskaya, N.A. Medvedeva, O.S. Medvedev // Cell and Tissue biology. – 2021. – V. 15. – №3. – P. 260-266.
3. **Шаповал Н.С.** Влияние окисленной и восстановленной форм коэнзима Q10 (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эндотелия в модели гематоэнцефалического барьера [Текст] / **Н.С. Шаповал**, О.С. Медведев, Н.А. Медведева, А.В. Моргун, Е.Б. Бойцова, Е.Д. Осипова, А.Б. Салмина // Цитология. – 2020. – Т. 62. – №6. – С. 428-436.
4. **Шаповал Н.С.** Митохондрии клеток церебрального эндотелия как потенциальная мишень для нейропротекторного действия коэнзима Q10 [Текст] / **Н.С. Шаповал**, О.С. Медведев, А.В. Моргун, С.К. Антонова, А.Б. Салмина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83. – №3. – С. 40-46.

5. Каленикова Е.И. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима Q10 у крыс после внутривенного введения убихинола [Текст] / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.Н. Оболенская, **Н.С. Шаповал**, В.Г. Макаров, О.С. Медведев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – №6 – С. 149-152. Kalenikova E.I. Tissue-Level Dynamics and Redox State of Coenzyme Q10 in Rats After Intravenous Injection of Ubiquinol [Text] / E.I. Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, O.N. Obolenskaya, **N.S. Shapoval**, V.G. Makarov, O.S. Medvedev // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2018. – V 52. – № 8. – P. 690-693.

Тезисы докладов всероссийских и международных конференций, в том числе опубликованные в приложениях к журналам, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science

1. **Shapoval N.** TISSUE DISTRIBUTION AND REDOX STATUS OF COENZYME Q10 AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF UBIQUINOL TO RAT [Text] / **N. Shapoval**, O. Obolenskaia, E. Kalenikova, E. Gorodetskaya, O. Medvedev // Journal of Hypertension. – 2018. – V. 36. – P. 149-150.
2. Каленикова Е.И. Фармакокинетика и тканевое распределение убихинола при внутривенном введении [Текст] / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.Н. Оболенская, **Н.С. Шаповал**, О.С. Медведев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – С. 103–104.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова М. А. Нейропротекторная эффективность коэнзима Q10 на модели фокальной ишемии головного мозга в эксперименте. Дисс. к. м. н.: 14.03.06 [Текст] / М. А. Белоусова // Москва. 2015. – С. 162.
2. Васина Л. В. Функциональная гетерогенность эндотелия (обзор) [Текст] / Л. В. Васина, Т. Д. Власов, Н. Н. Петрищев // Артериальная гипертензия. – 2017. Т. – 23, №2. – С 88–102.
3. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга [Текст] / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова // М.: Медицина – 2001.
4. Емельянчик Е. Ю. Функциональное состояние эндотелия у больных легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с врожденными пороками сердца [Текст] / Е. Ю. Емельянчик, Н. Г. Вольф, О. А. Ваземиллер, А. Б. Салмина // Кардиология. – 2017. – Т. 57, №8. – С. 40–46.
5. Каленикова Е. И. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима Q10 у крыс после внутривенного введения убихинола [Текст] / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, Н. С. Шаповал, В. Г. Макаров, О. С. Медведев // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – №6 – С. 149-152.
6. Каленикова Е. И. Фармакокинетика и тканевое распределение коэнзима Q10 у при внутривенном введении в окисленной и восстановленной формах [Текст] / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, Н. С. Шаповал, В. Г. Макаров, О. С. Медведев // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55. – № 7. – С. 3-7.
7. Каленикова Е. И. Фармакокинетика и тканевое распределение убихинола при внутривенном введении [Текст] / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, Н. С. Шаповал, О. С. Медведев //

Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – С. 103–104.

8. Кувачева Н. В. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации [Текст] / Н. В. Кувачева, А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. А. Малиновская, А. В. Моргун, Е. А. Пожиленкова, Г. С. Замай, Н. А. Язуина, М. М. Петрова // Журнал неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113, №4. – С. 80.

9. Куляк О. Ю. Доклиническое исследование фармакокинетики инновационного препарата коэнзима Q10. Дис. к. фарм. н.: 14.03.06, 14.04.02 [Текст] / О. Ю. Куляк // Москва. 2018. – С. 131.

10. Мельникова Ю. С. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней [Текст] / Ю. С. Мельникова, Т. П. Макарова // Казанский мед.ж. – 2015. – Т.94, №4. – С. 659–665.

11. Моргун А. В. Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние проблемы и перспективы [Текст] / А. В. Моргун, Н. В. Кувачева, Ю. К. Комлева, Е. А. Пожиленкова, И. А. Кутищева, Е. С. Гагарина, Т. Е. Таранушенко, А. В. Озерская, О. С. Окунева, А. Б. Салмина // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2012. – №4. – С.42–50.

12. Салмина А. Б. Коннексиновые и паннексиновые транспортные системы в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга [Текст] / А. Б. Салмина, Н. А. Малиновская, Н. В. Кувачева, А. В. Моргун, Е. Д. Хилажева, Я. В. Горина, Е. А. Пожиленкова, О. В. Фролова // Нейрохимия. – 2014. – Т.31, № 2. – С. 122–133.

13. Салмина А. Б. Эндотелиальные прогениторные клетки в развитии и восстановлении церебрального эндотелия [Текст] / А. Б. Салмина, А. В.

Моргун, Н. В. Кувачева, Е. А. Пожиленкова, Ю. Р. Солончук, О. Л. Лопатина, Ю. К. Комлева, Т. Е. Таранушенко // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т.6, №4. – С.213–222.

14. Сибиряк С. Апоптоз и иммунная система [Текст] / С. Сибиряк, О. М. Капулер, Н. Н. Курчатова, Д. А. Каут, Р. Ш. Юсупова, Е. В. Нелюбин // Медицинский вестник Башкортостана – 2006. – Т.1, №1. С. – 127–133.

15. Скворцова В. И. Оксидантный стресс и кислородный статус при ишемическом инсульте [Текст] / В. И. Скворцова, Я. Р. Нарциссов, М. К. Бодыхов, И. В. Кичук, Н. А. Пряникова, Ю. В. Гудкова, Т. Д. Солдатенкова, Т. Т. Кондрашова, Е. В. Калинина, М. Д. Новичкова, А. Б. Шутьева, О. Б. Кербики // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2007. – Т. 107, № 1. – С. 30-37.

16. Хилажева Е. Д. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro* [Текст] / Е. Д. Хилажева, Е. Б. Бойцова, Е. А. Пожиленкова, Ю. Р. Солончук, А. Б. Салмина // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 10. – С. 710.

17. Хилажева Е. Д. Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриальный биогенез в клетках эндотелия церебральных микрососудов [Текст] / Е. Д. Хилажева, Н. В. Писарева, А. В. Моргун, Бойцова Е. Б., Таранушенко Т. Е., Фролова О. В., Салмина А. Б. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2017. – Т.11, №1. – С.34–39.

18. Черных А. И. Провоспалительный фенотип периваскулярной астроглии и CD133+-клеток-предшественников эндотелиоцитов при моделировании болезни Альцгеймера у мышей [Текст] / А. И. Черных, Ю. К. Комлева, Я. В. Горина, О. Л. Лопатина, С. И. Пащенко, А. Б. Салмина // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2018. – Т.3, №1. – С.6–15.

19. Шаповал Н.С. Влияние убихинола на состояние церебральных эндотелиоцитов в различных структурах головного мозга крыс [Текст] / Н.С.

Шаповал, Н.А. Малиновская, А.В. Моргун, А.Б. Салмина, О.Н. Оболенская, Н.А. Медведева, О.С. Медведев // Цитология. – 2020. – Т. 62. – №12. – С. 894-902.

20. Шаповал Н. С. Влияние окисленной и восстановленной форм коэнзима Q10 (убихинона и убихинола) на клетки церебрального эндотелия в модели гематоэнцефалического барьера [Текст] / Н. С. Шаповал, О. С. Медведев, Н. А. Медведева, А. В. Моргун, Е. Б. Бойцова, Е. Д. Осипова, А. Б. Салмина // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 6. – С. 428–436.

21. Abbott N. J. Structure and function of the blood–brain barrier [Text] / N. J. Abbott, A. Patabendige, D. Dolman, S. R. Yusof, D. J. Begley // Neurobiology of Disease. – 2010. – V.37, №1. – P. 13–25.

22. Aberg F. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues [Text] / F. Aberg, E. L. Appelkvist, G. Dallner, L. Ernster // Arch Biochem Biophys. 1992. – V. 295, №2. – P. 230–234.

23. Ahuja P. Divergent mitochondrial biogenesis responses in human cardiomyopathy [Text] / P. Ahuja, J. Wanagat, Z. Wang, Y. Wang, D. A. Liem, P. Ping, I. A. Antoshechkin, K. B. Margulies, W. R. Maclellan // Circulation. – 2013. – V.127, №19. – P.1957-1967.

24. Anderson J. M. Physiology and function of the tight junction [Text] / J. M. Anderson, C. M. Van Itallie // Cold Spring Harb Perspect Biol. 1. – 2009. – №a002584.

25. Arakawa S. Identification of a novel compound that inhibits both mitochondria-mediated necrosis and apoptosis [Text] / S. Arakawa, I. Nakanomyo, Y. Kudo-Sakamoto, H. Akazawa, I. Komuro, S. Shimizu // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2015. – V.467, №4. – P.1006–1011.

26. Azhdari M. High efficient isolation and characterization of endothelial cells from newborn cord blood veins [Text] / M. Azhdari, H. Baharvand, M. Baghaban-Eslaminejad, N. Aghdami // *Journal of Clinical Developmental Biology*. – 2016. – V.1, №3 (14). – P. 1 – 7.
27. Bradbury M. W. The blood-brain barrier [Text] / M. W. Bradbury // *Exp. Physiol.* – 1993. – V.78 – P. 453–472.
28. Buckley C. D. Identification of $\alpha\beta 3$ as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1 [Text] / C. D. Buckley, R. Doyonnas, J. P. Newton, S. D. Blystone, E. J. Brown, S. M. Watt, D. L. Simmons // *J. Cell Sci.* – 1996. – V. 109. – P. 437.
29. Bukeirat M. MiR-34a regulates blood–brain barrier permeability and mitochondrial function by targeting cytochrome C [Text] / M. Bukeirat, S. N. Sarkar, H. Hu, D. D. Quintana, J. W. Simpkins, X. Rencorresponding // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2016. – V. 36, №2. – P. 387–392.
30. Caja S. Mitochondria in endothelial cells: Sensors and integrators of environmental [Text] / S. Caja, J. A Enriqueza. // *Redox Biology*. – 2017. – V. 12. – P. 821–827.
31. Cali T. Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration [Text] / T. Cali, D. Ottolini, M. Brini // *Cell Calcium*. – 2012. – V. 52. – P.73–85.
32. Campbell H. K. Interplay between tight junctions & adherens junctions [Text] / H. K. Campbell, J. L. Maiers, K. A. DeMali // *Experimental cell research*. – 2017. – V. 358, №1. – P. 39–44.
33. Davis B. M. Topical coenzyme Q10 demonstrates mitochondrial-mediated neuroprotection in a rodent model of ocular hypertension [Text] / B. M. Davis, K. Tian, M. Pahlitzsch, J. Brenton, N. Ravindran, G. Butt, G. Malaguarnera, E. M. Normando, L. Guo, M. F. Cordeiro // *Mitochondrion*. – 2017. – V. 36. – P. 114.

34. DeLisser H. M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis [Text] / H. M. DeLisser, M. Christofidou-Solomidou, R. M. Strieter, M. D. Burdick, C. S. Robinson, R. S. Wexler, J. S. Kerr, C. Garlanda, J. R. Merwin, J. A. Madri, S. M. Albelda // *Am. J. Pathol.* – 1997. – V. 151. – P. 671.
35. DeLisser H. M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31 [Text] / H. M. DeLisser, P. J. Newman, S. M. Albelda // *Immunol. Today.* – 1994. – V. 15. – P. 490.
36. Diaz F. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors [Text] / F. Diaz, H. Kotarsky, V. Fellman, C. T. Moraes // *Semin. Fetal Neonatal Med.* – 2011. – V. 16. – P. 197–204.
37. Doll D. N. Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood-Brain Barrier [Text] / D. N. Doll, H. Hu, J. Sun, S. E. Lewis, J. W. Simpkins, X. Ren // *Stroke.* – 2015. – V. 46, №6. – P. 1681–1689.
38. Duran-Prado M. Coenzyme Q10 Protects Human Endothelial Cells from β -Amyloid Uptake and Oxidative Stress-Induced Injury [Text] / M. Duran-Prado, J. Frontinan, R. Santiago-Mora, J. R. Peinado, C. Parrado-Fernandez, M. V. Gomez-Almagro, M. Moreno, J. A. Lopez-Dominguez, J. M. Villalba, F. J. Alcain // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, №10. – P. 1–13.
39. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier [Text] / B. Engelhardt // *Cell Tissue Res.* – 2003. – V. 314. – P. 119–129.
40. Ehrlich P. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie [Text] / P. Ehrlich // *A. Hirschwald.* – 1885. – P. 167.
41. Ehrlich P. Ueber die Beziehungen von chemischer Constitution, Verteilung und Pharmakologischer Wirkung [Text] / P. Ehrlich // *Gesammelte Arbeiten zur Immunitaetsforschung.* – 1904. – P. 574.

42. Fedacko J. Coenzyme Q10 in Heart and Brain Diseases [Text] / J. Fedacko, D. Pella, P. Fedackova, V. Vargova, F. Meester, P. Durcikova, R. B. Singh // *The Open Nutraceuticals Journal*. – 2011. – V.4. – P. 69–87.
43. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [Text] / C. Förster // *Histochem Cell Biol*. – 2008. – V. 130, №1. – P. 55–70.
44. Gastfriend B. D. Modeling the blood-brain barrier: Beyond the endothelial cells [Text] / B. D. Gastfriend, S. P. Palecek, E. V. Shusta // *Curr. Opin. Biomed. Eng.* – 2018. – V. 5 – P. 6–12.
45. Ghani S. M. A. Comparing the effects of vitamin E tocotrienol-rich fraction supplementation and α -tocopherol supplementation on gene expression in healthy older adults [Text] / S. M. A. Ghani, J. A. Goon, N. H. E. N. Azman, S.N.A. Zakaria, Z. Hamid, W.Z.W. Ngah // *Clinics*. – 2019. – V. 74. – P. 1–15.
46. Gimbrone Jr M. A. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis [Text] / Jr M. A. Gimbrone, G. Garcia-Cardena // *Circ Res*. – 2016. – V. 118, №4. – P. 620–636.
47. Greenberg S. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease [Text] / S. Greenberg, W.H. Firishman // *J Clin Pharmacol*. – 1990. – V. 30. – P. 596–608.
48. Guo S. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons [Text] / S. Guo, W. J. Kim, J. Lok, S. R. Lee, E. Besancon, B. H. Luo, M. F. Stins, X. Wang, S. Dedhar, E. H. Lo // *PNAS* – 2008. – V. 105, №21. – P. 7582–7587.
49. Guo Z. E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics [Text] / Z. Guo, L. J. Neilson, H. Zhong, P. S. Murray, S. Zanivan, R. Zaidel-Bar // *Sci Signal*. – 2014. – V. 7, №354. – P. 1–13.

50. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. [Text] / A. Hall // Science. – 1998. – V. 279. – P. 509.
51. Hartmann C. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: An in vitro study [Text] / C. Hartmann, A. Zozulya, J. Wegener, H. J. Galla // Experimental Cell Research. – 2007. – V. 313. – P. 1318–1325.
52. Hawkins B. T. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease [Text] / B. T. Hawkins, T. P. Davis // Pharmacological Reviews. – 2005. – V. 57, №2. – P. 173–185.
53. Hirano T. Interaction of coenzyme Q10 with the intestinal drug transporter P-glycoprotein [Text] / T. Hirano, K. Iseki / J. Agric. Food Chem. – 2008. – V. 56. – P. 6923.
54. Hu H. Mitochondrial Impairment in Cerebrovascular Endothelial Cells is Involved in the Correlation between Body Temperature and Stroke Severity [Text] / H. Hu, D. N. Doll, J. Sun, S. E. Lewis, J. H. Wimsatt, M. J. Kessler, J. W. Simpkins, X. Ren // Aging and Disease. – 2016. – V. 7, №1. – P. 14–27.
55. Hubner K. Wnt/ β -catenin signaling regulates VE-cadherin-mediated anastomosis of brain capillaries by counteracting S1pr1 signaling [Text] / K. Hubner, P. Cabochette, R. Dieguez-Hurtado, C. Wiesner, Y. Wakayama, K. S. Grassme, M. Hubert, S. Guenther, H. G. Belting, M. Affolter, R. H. Adams, B. Vanhollebeke, W. Herzog // Nat. Commun. – 2018. – V. 9, №4860. – P. 1–17.
56. Huo J. Coenzyme Q10 Prevents Senescence and Dysfunction Caused by Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells [Text] / J. Huo, Z. Xu, K. Hosoe, H. Kubo, H. Miyahara, J. Dai, M. Mori, J. Sawashita, K. Higuchi // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2018. – P. 1–15.

57. Ibrahim W. H. Dietary Coenzyme Q10 and Vitamin E Alter the Status of These Compounds in Rat Tissues and Mitochondria [Text] / W. H. Ibrahim, H. N. Bhagavan, R. K. Chopra, C. K. Chow // *The Journal of Nutrition*. – 2000. – V. 130, №9. – P. 2343–2348.
58. Indra I. Spatial and temporal organization of cadherin in punctate adherens junctions [Text] / I. Indra, J. Choi, C. S. Chen, R. B. Troyanovsky, L. Shapiro, B. Honig, S.M. Troyanovsky // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2018. – V. 115, №19. – P. 4406–4415.
59. Ishiyama N. Force-dependent allostery of the α -catenin actin-binding domain controls adherens junction dynamics and functions [Text] / N. Ishiyama, R. Sarpal, M. N. Wood, S. K. Barrick, T. Nishikawa, H. Hayashi, A. B. Kobb, A. S. Flozak, A. Yemelyanov, R. Fernandez-Gonzalez, S. Yonemura, D. E. Leckband, C. J. Gottardi, U. Tepass, M. Ikura // *Nat Commun*. – 2018. – V. 9, №5121. – P. 1–17.
60. Isobe C. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process [Text] / C. Isobe, T. Abe, Y. Terayama // *J. Neurol*. – 2010. – V. 257. – P. 399–404.
61. Kaisara M. A. Protecting the BBB Endothelium against Cigarette SmokeInduced Oxidative Stress Using Popular Antioxidants: Are they really beneficial? [Text] / M. A. Kaisara, S. Prasada, L. Cucullo // *Brain Res*. – 2015. – V. 1627. – P. 90–100.
62. Kahles T. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke [Text] / T. Kahles, P. Luedike, M. Endres, H. J. Galla, H. Steinmetz, R. Busse, T. Neumann-Haefelin, R. P. Brandes // *Stroke*. – 2007. – V. 38. – P. 3000.

63. Kalayci M. Effect of Coenzyme Q10 on ischemia and neuronal damage in an experimental traumatic brain-injury model in rats [Text] / M. Kalayci, M. M. Unal, S. Gul, S. Acikgoz, N. Kandemir, V. Hanci, N. Edebali, B. Acikgoz // *BMC Neuroscience*. – 2011. – V. 12, №75. – P. 1–7.
64. Kalenikova E. I. Preclinical Study of the Pharmacokinetics of a New Intravenous Dosage Form of Ubiquinol [Text] / E. I. Kalenikova, E. A. Gorodetskaya, O. Yu. Kulyak, L. P. Kozaeva, V. G. Makarov, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, O. S. Medvedev // *Pharm. Chem. J.* – 2018. – V. 51, №11. – P. 949–953.
65. Kallmann B. A. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells [Text] / B. A. Kallmann, S. Wagner, V. Hummel, M. Buttman, A. Bayas, J.C. Tonn, P. Rieckmann // *FASEB J.* – 2002. – V. 16, №6. – P. 589–591.
66. Kaneko Y. Contribution of Pannexin 1 and Connexin 43 Hemichannels to Extracellular Calcium-Dependent Transport Dynamics in Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells [Text] / Y. Kaneko, M. Tachikawa, R. Akaogi, K. Fujimoto, M. Ishibashi, Y. Uchida, P.O. Couraud, S. Ohtsuki, K. Hosoya, T. Terasaki // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2015. – V. 353, №1. – P. 192–200.
67. Kasparova S. Effect of coenzyme Q10 and vitamin E on brain energy metabolism in the animal model of Huntington's disease [Text] / S. Kasparova, Z. Sumbalova, P. Bystricky, J. Kucharska, T. Liptaj, V. Mlynarik, A. Gvozdjakova // *Neurochem Int.* – 2006. – V. 48. – P. 93–99.
68. Katusic Z. S. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind [Text] / Z. S. Katusic, S. A. Austin // *Eur. Heart J.* – 2014. – V. 35, № 14. – P. 888–894.

69. Khilazheva E. D. Obtaining a three-cell model of a neurovascular unit in vitro. [Text] / E. D. Khilazheva, E. B. Boytsova, E. A. Pozhilenkova, Yu. R. Solonchuk, A. B. Salmina // *Cell Tiss. Biol.* – 2015. – V. 9, № 6. – P. 447.
70. Kluge M. A. Mitochondria and Endothelial Function [Text] / M. A. Kluge, J. L. Fetterman, J. A. Vita // *Circ Res.* – 2013. – V. 112, №8. – P.1171–1188.
71. Kluger M. S. Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells [Text] / M. S. Kluger, P. R. Clark, G. Tellides, V. Gerke, J. S. Pober // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* –2013. – V. 33. – P. 489.
72. Krause G. Structure and function of claudins [Text] / G. Krause, L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek, I. E. Blasig // *Biochimica Et Biophysica Acta.* – 2008. – V. 1778, №3. – P. 631–645.
73. Kubota K. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions [Text] / K. Kubota, M. Furuse, H. Sasaki, N. Sonoda, K. Fujita, A. Nagafuchi, S. Tsukita // *Curr Biol.* – 1999. – V. 9. – P. 1035–1038.
74. Kumar A. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome [Text] / A. Kumar, H. Kaur, P. Devi, V. Mohan // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2009 – V. 124. – P. 259–268.
75. Li X. F. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice. [Text] / X. F. Li, X. J. Zhang, C. Zhang, L. N. Wang, Y. R. Li, Y. Zhang, T. T. He, X. Y. Zhu, L. L. Cui, B. L. Gao // *Exp Neurol.* – 2018. – V. 302. – P. 68–74.
76. Li J. Activation of HO-1 protects placental cells function in oxidative stress via regulating ZO-1/occluding [Text] / J. Li, J. Zhou, B. Tian, Y. Chu, N. Zhang,

X. Hu, X. Wan, Y. Ye // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2019. – V. 16, № 511 (4). – P. 903–909.

77. Liaudanskaya V. Modeling Controlled Cortical Impact Injury in 3D Brain-Like Tissue Cultures [Text] / V. Liaudanskaya, J.Y. Chung, C. Mizzoni, N. Rouleau, A. N. Berk, L. Wu, J. A. Turner, I. Georgakoudi, M. J. Whalen, T. J. F. Nieland, D. L. Kaplan // *Adv Healthc Mater.* – 2020. – e2000122.

78. Lin C. S. Role of Mitochondrial DNA Copy Number Alteration in Human Renal Cell Carcinoma [Text] / C. S. Lin, H. T. Lee, M. H. Lee, S. C. Pan, C. Y. Ke, A.W. Chiu, Y. H. Wei // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V.17, №6 (814) - P.1–14.

79. Liu X. Structure of the heterophilic interaction between the nectin-like 4 and nectin-like 1 molecules [Text] / X. Liu, T. An, D. Li, Z. Fan, P. Xiang, C. Li, W. Ju, J. Li, G. Hu, B. Qin, B. Yin, J. A. Wojdyla, M. Wang, J. Yuan, B. Qiang, P. Shu, S. Cui, X. Peng // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2019. – V. 116, №6. – P. 2068–2077.

80. Liu K. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke [Text] / K. Liu, L. Guo, Z. Zhou, M. Pan, C. Yan // *Microvascular Research.* – 2019. – V. 123. – P. 74–80.

81. Liu Y. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells [Text] / Y. Liu, Q. Xue, Q. Tang, M. Hou, H. Qi, G. Chen, W. Chen, J. Zhang, Y. Chen, X. Xu // *Microvasc. Res.* – 2013. – V. 90. – P. 199.

82. Machesky L.M. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex [Text] / L.M. Machesky, R.H. Insall // *Curr. Biol.* – 1998. – V. 8. – P. 1347.

83. Martins E. Newly Synthesized oxygenated xanthenes as potential p-glycoprotein activators: In vitro, ex vivo, and in silico studies [Text] / E. Martins, V. Silva, A. Lemos, A. Palmeira, P. Puthongking, E. Sousa, C. Rocha-Pereira, C. I. Ghanem, H. Carmo, F. Remião, R. Silva // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – P. 707.
84. Maruo T. Involvement of l-afadin, but not s-afadin, in the formation of puncta adherentia junctions of hippocampal synapses [Text] / T. Maruo, S. Sakakibara, M. Miyata, Y. Itoh, S. Kurita, K. Mandai, T. Sasaki, Y. Takai // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 92. – P. 40–49.
85. Matthews R. T. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects [Text] / R. T. Matthews, L. Yang, S. Browne, M. Baik, M. F. Beal // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95. – P. 8892–8897.
86. Miller D. S. Signaling pathways that regulate basal ABC transporter activity at the blood-brain barrier [Text] / D. S. Miller, R. E. Cannon // *CurrЮ PharmЮ Des.* – 2014. – V. 20. – P. 1463.
87. Miller D. S. Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy [Text] / D. S. Miller, S. N. Nobmann, H. Gutmann, M. Toeroek, J. Drewe, G. Fricker // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – V. 58. – P. 1357.
88. Mohammadi M. T. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemiain normal rat [Text] / M. T. Mohammadi, S. M. Shid-Moosavi, G. A. Dehghani // *Pathophysiology*. – 2012. – V. 19, № 1. – P. 13–20.
89. More V. R. PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood-brain barrier efflux transporter expression [Text] / V. R. More, C. R. Campos, R. A. Evans, K. D. Oliver, G. N. Chan, D. S. Miller, R. E. Cannon // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2017. – V. 37. – P. 1199.

90. Murgia M. Controlling metabolism and cell death: At the heart of mitochondrial calcium signaling [Text] / M. Murgia, C. Giorgi, P. Pinton, R. Rizzuto // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2009. – V. 46. – P. 781–788.
91. Naci D. Cell adhesion to collagen promotes leukemia resistance to doxorubicin by reducing DNA damage through the inhibition of Rac1 activation [Text] / D. Naci, S. Berrazouane, F. Barabe, F. Aoudjit // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 19455.
92. Nagasawa K. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells [Text] / K. Nagasawa, H. Chiba, H. Fujita, T. Kojima, T. Saito, T. Endo, N. Sawada // *Journal of Cellular Physiology*. – 2006. – V. 208, №1. – P. 123–132.
93. Nagib M. M. Ameliorative Effects of α -Tocopherol and/or Coenzyme Q10 on Phenytoin-Induced Cognitive Impairment in Rats: Role of VEGF and BDNF-TrkB-CREB Pathway [Text] / M. M. Nagib, M. G. Tadros, R. M. Rahmo, N. A. Sabri, A. E. Khalifa, S. I. Masoud // *Neurotox. Res.* – 2019. – V. 35, №2. - P. 451–462.
94. Nascimento A. M. M. A. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus [Text] / A. M. M. A. Nascimento, I. J. Sequeira, D. F. Vasconcelos, L. Gandolfi, R. Pratesi, Y. K. M. Nobrega // *Arch. Endocrinol. Metab.* – 2017. – V. 61, №5. – P. 476–483.
95. Neergheen V. Coenzyme Q10 in the Treatment of Mitochondrial Disease [Text] / V. Neergheen, A. Chalasani, L. Wainwright, D. Yubero, R. Montero, R. Artuch, I. Hargreaves // *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. – 2017. – V. 5. – P. 1–8.
96. Nekrasov E. D. Mitochondrial distribution violation and nuclear indentations in neurons differentiated from iPSCs of Huntington's disease patients [Text] / E. D.

Nekrasov, S. L. Kiselev // *J. Stem. Cells Regen. Med.* – 2018. – V. 14, №2. – P. 80–85.

97. Nisoli E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide [Text] / E. Nisoli, E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada, M.O. Carruba // *Science.* – 2003. – V. 299, №5608. – P. 896–999.

98. Nitta T. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [Text] / T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, S. Tsukita // *J. Cell Biol.* – 2003. – V. 161. – P. 653.

99. Niu Y. J. Ubiquinol-10 delays postovulatory oocyte aging by improving mitochondrial renewal in pigs [Text] / Y. J. Niu, W. Zhou, Z. W. Nie, D. Zhou, Y. N. Xu, S. A. Ock, C. G. Yan, X. S. Cui // *Aging (Albany NY).* – 2020. – V. 12. – P. 1256.

100. Obermeier B. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier [Text] / B. Obermeier, R. Daneman, R. M. Ransohoff // *Nat Med.* – 2013. – V. 19, №12. – P. 1584–1596.

101. Orellana J. A. Modulation of Brain Hemichannels and Gap Junction Channels by Pro-Inflammatory Agents and Their Possible Role in Neurodegeneration [Text] / J. A. Orellana, P. J. Saez, K. F. Shoji, K. A. Schalper, N. Palacios-Prado, V. Velarde, C. Giaume, M. V. L. Bennett, J. C. Saez // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – V. 11, №2. – P. 369–399.

102. Orlando P. Effect of ubiquinol supplementation on biochemical and oxidative stress indexes after intense exercise in young athletes [Text] / P. Orlando, S. Silvestri, R. Galeazzi, R. Antonicelli, F. Marcheggiani, I. Cirilli, T. Bacchetti, L. Tiano // *Redox Rep.* – 2018. – V. 23. – P. 136.

103. Park L. Abeta-induced vascular oxidative stress and attenuation of functional hyperemia in mouse somatosensory cortex [Text] / L. Park, J. Anrather, C. Forster, K. Kazama, G. A. Carlson, C. Iadecola // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2004. – V. 24. – P. 334–342.
104. Park S. Y. E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- κ B in AGS cells [Text] / S. Y. Park, J. H. Shin, S. H. Kee // *Cancer Sci.* – 2017. – V. 108. – P. 1769–1777.
105. Payapilly A. Compartmentalisation of RAC1 signalling [Text] / A. Payapilly, A. Malliri // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2018. – V. 54. – P. 50.
106. Pozhilenkova E. A. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain [Text] / E. A. Pozhilenkova, O. L. Lopatina, Y. K. Komleva, V. V. Salmin, A. B. Salmina // *Reviews in the neurosciences.* – 2017. – V. 28, №4. – P. 397–415.
107. Qiu C. Placental mitochondrial DNA content and placental abruption: a pilot study [Text] / C. Qiu, S. E. Sanchez, K. Hevner, D. A. Enquobahrie, M. A. Williams // *BMC Res Notes.* – 2015. – V. 8, № 447. – P. 1–6.
108. Rayasam G. V. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake [Text] / G. V. Rayasam, V. K. Tulasi, R. Sodhi, J. A. Davis, A. Ray // *British Journal of Pharmacology.* – 2009. – V. 156, №6. – P. 885–898.
109. Reese T. S. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase [Text] / T. S. Reese, M. J. Karnovsky // *Journal of Cell Biology.* – 1967. – V. 34, №1. – P. 207–217.
110. Ren X. Deciphering the Blood-Brain Barrier Damage in Stroke: Mitochondrial Mechanism [Text] / X. Ren, J. W. Simpkins // *J Neuroinfect Dis.* – 2015. – V. 6, № 2.

111. Ridley A. J. Rho proteins, PI 3-kinases and monocyte/ macrophage motility [Text] / A. J. Ridley // *FEBS Lett.* – 2001. – V. 498. – P. 168.
112. Salehpour F. Photobiomodulation and Coenzyme Q10 Treatments Attenuate Cognitive Impairment Associated With Model of Transient Global Brain Ischemia in Artificially Aged Mice [Text] / F. Salehpour, F. Farajdokht, J. Mahmoudi, M. Erfani, M. Farhoudi, P. Karimi, S. H. Rasta, S. Sadigh-Eteghad, M. R. Hamblin, A. Gjedde // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* – 2019. – V. 13, № 74. – P. 1–17.
113. Salmina A. B. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function [Text] / A. B. Salmina, N. V. Kuvacheva, A. V. Morgun, Y. K. Komleva, E. A. Pozhilenkova, O. L. Lopatina, Y. V. Gorina, T. E. Taranushenko, L. L. Petrova // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* – 2015. – V. 64. – P. 174–184.
114. Sanchez-Covarrubias L. Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? [Text] / L. Sanchez-Covarrubias, L. M. Slosky, B. J. Thompson, T. P. Davis, P. T. Ronaldson // *Current Pharmaceutical Design.* – 2014. – V. 20, №10. – P.1422–1449.
115. Santos G. C. Coenzyme Q10 and its effects in the treatment of neurodegenerative diseases [Text] / G. C. Santos, L. M. G. Antunes, A. C. Santos, M. Bianchi // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2019. – V. 45, №4. – P. 607–618.
116. Sena L. A. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species [Text] / L. A. Sena, N.S. Chandel // *Molecular Cell.* – 2012. – V. 48. – P. 158-167.
117. Shapoval N. Tissue distribution and redox status of coenzyme Q10 after intravenous administration of ubiquinol to rat [Text] / N. Shapoval, O. Obolenskaia, E. Kalenikova, E. Gorodetskaya, O. J. Medvedev // *Hypertension.* – 2018. – V. 36. – P. 149.

118. Sharom F. J. ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance [Text] / F. J. Sharom // *Pharmacogenomics*. – 2008. – V. 9. – P. 105.
119. Shults C. W. Clinical trials of coenzyme Q10 in neurological disorders [Text] / C. W. Shults, R. Haas // *BioFactors* – 2005. – V. 25. – P. 117–126.
120. Smith C. W. Adhesion molecules and receptors [Text] / C. W. Smith // *J Allergy Clin Immunol*. – 2008. – V. 121. – P. 375.
121. Srinivasan B. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems [Text] / B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, J. J. Hickman // *J. Lab. Autom.* – 2015. – V. 20. – P. 107.
122. Sun J. CoQ10 ameliorates mitochondrial dysfunction in diabetic nephropathy through mitophagy [Text] / J. Sun, H. Zhu, X. Wang, Q. Gao, Z. Li, H. J. Huang // *Endocrinol.* – 2019. – JOE-18-0578.R1.
123. Sundaresan M. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac 1 [Text] / M. Sundaresan, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, D.J. Sulciner, S. Gutkind, K.J. Irani, P.J. Goldschmidt-Clermont, T. Finkel // *Biochem. J.* – 1996. – V. 318. – P. 379.
124. Takahashi T. Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions [Text] / T. Takahashi, K. Okamoto, K. Mori, H. Sayo, T. Kishi // *Lipids*. – 1993 – V. 28, №9. – P. 803–809.
125. Tatsuta Y. Imaging mass spectrometry analysis of ubiquinol localization in the mouse brain following short-term administration [Text] / Y. Tatsuta, K. Kasai, C. Maruyama, Y. Hamano, K. Matsuo, S. Taira // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7, №12990. – P. 1-7.
126. Tian S. Coenzyme Q10 enhances the expression of Bcl-2 and inhibits the expressions of Bax and GSK-3 β in the hippocampus of rats exposed to

ischemia/reperfusion injury [Text] / S. Tian, D. Wang, X. Li, J. Tang, G. Han, Y. Dai // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. – 2013. – V. 29, №7. – P. 698–701.

127. Tolias K. F. Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly [Text] / K. F. Tolias, J. H. Hartwig, H. Ishihara, Y. Shibasaki, L. C. Cantley, C. L. Carpenter // *Curr. Biol*. – 2000. – V. 10. – P. 153.

128. Tran M. T. Role of Coenzyme Q10 in Chronic Heart Failure, Angina, and Hypertension [Text] / M. T. Tran, T. M. Mitchell, D. T. Kennedy, J. T. Giles // *Pharmacotherapy*. – 2001. – V. 21, №7. – P. 797–806.

129. Tsai H. Y. Coenzyme Q10 attenuates high glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction through AMP-activated protein kinase pathways [Text] / H. Y. Tsai, C. P. Lin, P. H. Huang, Y. Fan, X. Deng // *J. Diabetes Res*. – 2016. – 6384759.

130. Tsuneki H. Coenzyme Q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [Text] / H. Tsuneki, N. Sekizaki, T. Suzuki, S. Kobayashi, T. Wada, T. Okamoto, I. Kimura, T. Sasaoka // *Eur. J. Pharmacol*. – 2007. – V. 566. – P. 1.

131. Vacek J. C. Tetrahydrocurcumin ameliorates homocysteine-mediated mitochondrial remodeling in brain endothelial cells [Text] / J. C. Vacek, J. Behera, A.K. George, P.K. Kamat, A. Kalani, N. Tyagi // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – V. 233, №4. – P. 3080–3092.

132. Van Itallie C. M. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts [Text] / C. M. Van Itallie, J. M. Anderson // *J Cell Sci*. – 1997. – V. 110, № 9. – P. 1113–1121.

133. Werner E. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases [Text] / E. Werner, Z. Werb // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 158. – P. 357.
134. Wolf S. Die blut-hirn-schranke: eine besonderheit des cerebralen mikrozirkulationssystems [Text] / S. Wolf, B. Seehaus, K. Minol, H. G. Gassen // *Naturwissenschaften*, – 1996. – V. 83, №7. – P. 302–311.
135. Wong A. D. The blood-brain barrier: an engineering perspective [Text] / A. D. Wong, M. Ye, A. F. Levy, J. D. Rothstein, D. E. Bergles, P. C. Searson // *Frontiers in Neuroengineering*. – 2013. – V.6, №7. - P.1-22.
136. Yan X. J. Mitochondria play an important role in the cell proliferation suppressing activity of berberine [Text] / X. J. Yan, X. Yu, X. P. Wang, J. F. Jiang, Z. Y. Yuan, X. Lu, F. Lei, D. M. Xing // *Sci Res.* – 2017. – V. 7, №41712. – P. 1–13.
137. Yang X. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis [Text] / X. Yang, Y. Chang, W. Wei // *Mediators Inflamm.* – 2016. – V. 2. – P.1–9.
138. Yoritaka A. Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease [Text] / A. Yoritaka, S. Kawajiri, Y. Yamamoto, T. Nakahara, M. Ando, K. Hashimoto, M. Nagase, Y. Saito, N. Hattori // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2015. – V. 21. – P. 911–916.
139. Yu Q. Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension [Text] / Q. Yu, S. Y. Chan // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 967. – P.373–383.
140. Zhang H. Nano Copper Induces Apoptosis in PK-15 Cells via a Mitochondria-Mediated Pathway [Text] / H. Zhang, Z. Chang, K. Mehmood,

R.Z. Abbas, F. Nabi, M. U. Rehman, X. Wu, X. Tian, X. Yuan, Z. Li, D. Zhou // Biol. Trace. Elem. Res. – 2018. – V. 181, №1. – P. 6–70.

141. Zhang Y. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats [Text] / Y. Zhang, F. Aberg, E. L. Appelkvist, G. Dallner, L. Ernster // The Journal of Nutrition. – 1995. – V. 125, № 3. – P. 446–453.

142. Zhang Y. Restricted Uptake of Dietary Coenzyme Q Is in Contrast to the Unrestricted Uptake of α -Tocopherol into Rat Organs and Cells [Text] / Y. Zhang, M. Turunen, E. L. Appelkvist // J Nutr. – 1996. – V. 126, №9. – P. 2089–2097.

143. Zhang Y. Ubiquinol is superior to ubiquinone to enhance Coenzyme Q10 status in older men [Text] / Y. Zhang, J. Liu, X. Q. Chen, C. Y. Oliver Chen // Food Funct. – 2018. – V. 9. – P. 5653.

144. Zhou S. F. Structure, function and regulation of p-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition [Text] / S. F. Zhou // Xenobiotica. – 2008. – V. 38. –P. 802.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность:

Медведеву Олегу Стефановичу, д.м.н., профессору, заведующему кафедрой фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова за профессиональное руководство и сопровождение на всех этапах работы, поддержку и помощь в организационных вопросах, при постановке задач исследования и подготовке к публикациям результатов;

Салминой Алле Борисовне д.м.н., профессору, руководителю лаборатории экспериментальной нейрцитологии Научного центра неврологии, г.н.с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого за профессиональное руководство и сопровождение на всех этапах работы, поддержку и помощь в организационных вопросах, при постановке задач исследования и подготовке к публикациям результатов;

Медведевой Натальи Александровне, д.б.н., профессору, в.н.с. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за ценные советы, помощь, чуткость и вдохновляющую поддержку на этапах подготовки публикаций и диссертационной работы;

Моргун Андрею Васильевичу д.м.н., заведующему кафедрой поликлинической педиатрии и пропедевтики детских болезней с курсом ПО, декану педиатрического факультета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого за ценные советы, помощь и поддержку на этапах проведения части экспериментов, анализа данных, обоснования результатов и подготовки публикаций;

Малиновской Натальи Александровне, д.м.н., с.н.с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующей кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, *Хилажевой (Осиновой) Елене*

Дмитриевне н.с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, с.п. кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого и *Бойцовой Елизавете Борисовне* м.н.с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого за помощь в освоении методик и организации части экспериментов;

Оболенской Ольге Николаевне м.н.с. кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, за помощь в освоении методик и совместное выполнение части экспериментов;

Калениковой Елене Игоревне д.фарм.н., профессору, заведующей кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и *Городецкой Евгении Ароновне* к.б.н., доценту, с.н.с. кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова за помощь в освоении методик, организации части экспериментов, интерпретации результатов и публикациях;

Гусевой Александре Александровне, к.б.н., доценту кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за помощь в освоении статистических методов обработки данных;

Всем сотрудникам кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого за совместную работу и всестороннюю помощь;

Родным и друзьям за всестороннюю поддержку.