

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Факультет фундаментальной медицины

*На правах рукописи*

**КУРОПАТКИНА ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА**

**ЭФФЕКТЫ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОГО УБИХИНОЛА И СЕЛЕНА  
НА РАЗВИТИЕ МОНОКРОТАЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ  
ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У КРЫС. ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

1.5.5. Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Медведев Олег Стефанович

Доктор биологических наук, профессор

Медведева Наталья Александровна

Москва 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>ВВЕДЕНИЕ</i> .....	4
<i>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</i> .....	10
Характеристика CoQ10 и фармако-технологические особенности его препаратов .....	10
Фармакокинетические и фармакодинамические свойства CoQ10.....	11
Эффекты применения CoQ10 при заболеваниях сердечно-сосудистой системы .....	13
Эссенциальность селена и его распространение. Селеновый статус .....	17
Биологические свойства различных форм селена и его фармакокинетика .....	18
Значение дефицита селена для сердечно-сосудистой системы .....	19
Легочная гипертензия. Диагностика и классификация .....	23
Этиология и патогенез легочной гипертензии .....	26
Экспериментальные модели для изучения легочной гипертензии. ....	28
Механизм развития монокроталин-индуцированной легочной гипертензии .....	28
<i>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</i> .....	32
Животные и их содержание .....	32
Исследуемые препараты .....	32
Общая схема экспериментов .....	33
Манипуляции <i>in vivo</i> .....	37
Взвешивание животных и измерение систолического давления в хвостовой артерии .....	37
Определение фазы цикла у самок .....	37
Моделирование легочной гипертензии.....	38
Введение веществ и отбор крови .....	38
Проведение 1H и 19F МРТ-исследования легких .....	40
Регистрация гемодинамических параметров .....	41
Манипуляции <i>in vitro</i> .....	42
Морфометрическое исследование .....	42
Измерение реактивности изолированных сегментов лёгочных сосудов на вазоактивные факторы .....	42

Методика определения убихинола в печени крыс методом высокоэффективной газожидкостной хроматографии .....	44
Измерение уровня экспрессии микроРНК-21 и -34а .....	44
Определение активности глутатион-пероксидазы в гемолизате крови .....	45
Статистический анализ .....	46
<i>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</i> .....	<i>47</i>
Половые различия контрольных животных .....	47
Эффекты солюбилизованного убихинола на течение 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс .....	52
Эффекты солюбилизованного убихинола на течение 4х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов крыс .....	60
Влияние комбинации солюбилизованного убихинола и селена на течение 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс .....	66
<i>ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</i> .....	<i>78</i>
Влияние солюбилизованного убихинола на течение монокроталин-индуцированной легочной гипертензии различной степени тяжести у самцов и самок крыс .....	78
Влияние комбинации солюбилизованного убихинола и селена на течение 3-х недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс .....	83
<i>ВЫВОДЫ</i> .....	<i>88</i>
<i>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ</i> .....	<i>90</i>
<i>БЛАГОДАРНОСТИ</i> .....	<i>93</i>
<i>ЛИТЕРАТУРА</i> .....	<i>94</i>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность диссертационного исследования.** Считается, что возникновение многих сердечно-сосудистых заболеваний напрямую связано с недостатком коэнзима Q10 (CoQ10) – важного переносчика электронов в дыхательной цепи митохондрий [86]. Снижение концентрации CoQ10 происходит вследствие естественного старения клеток, неправильной диеты, употребления препаратов группы статинов и др. [83,86,126-128,210]. Убихинол (восстановленная форма CoQ10) является более активной молекулой и обладает большим окислительно-восстановительным потенциалом, чем убихинон (окисленная форма CoQ10), и гораздо эффективнее связывает свободные радикалы [128]. Однако проблема применения всех форм коэнзима Q10 заключается в его химических свойствах: вещество липофильно и его биодоступность при пероральном приеме составляет всего 0,1-3% [18,209]. Изучаемая лекарственная форма содержит солюбилизированный убихинол и отвечает требованиям для внутривенного применения, что позволяет быстро создавать и длительно поддерживать высокие концентрации убихинола в организме.

Для борьбы со свободно-радикальным повреждением клеток в организме существуют различные системы антиперекисной защиты, направленные на ликвидацию всех генерируемых в организме активных форм кислорода. Одним из таких семейств являются глутатион-пероксидазы и некоторые другие ферменты, в активном центре которых находится селен. Эффективность таких ферментов напрямую зависит от обеспеченности организма селеном [147]. Кроме того, недостаточность селена и селенопротеинов в организме ассоциируется с рядом кардиологических состояний, таких как, например, эндемическая кардиомиопатия Кешана, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и реперфузионная травма и некоторые другие [9].

Таким образом, убихинол и селен обладающие схожими функциями, вероятно, могут дополнять друг друга при профилактике и лечении патологий сердца. Патогенез выбранной модели, монокроталин-индуцированной легочной гипертензии, включает в себя такие звенья как оксидативный стресс и воспаление, которые служат мишенями для действия изучаемых веществ. Несмотря на наличие убедительных данных о благоприятных терапевтических эффектах CoQ10, действие убихинола при внутривенном введении или его сочетания с селеном на модели легочной гипертензии ранее изучено не было и является весьма перспективным направлением.

Легочная гипертензия (ЛГ) – патологическое состояние, характеризующееся повышением артериального давления в малом круге кровообращения выше 25 мм рт. ст. у людей и выше 40 мм рт. ст. у крыс и гипертрофией правого желудочка сердца [73,198]. Природа

возникновения легочной гипертензии мультифакторная [114], однако, одной из ведущих причин считается нарушение функции эндотелия и изменение реактивности гладких мышц сосудов к вазоактивным факторам, приводящие к увеличению сосудистого тонуса и гипертрофии сосудистой стенки и миокарда. Пусковым механизмом в развитии эндотелиальной дисфункции выступают появление большого количества свободных радикалов и возникновение воспалительных процессов в клетках эндотелия [114]. Заболевание существенно снижает качество жизни пациентов и зачастую имеет неблагоприятный прогноз [85]. Нужно отметить, что в проявлении заболевания существуют половые различия, именуемые «эстрадиоловым парадоксом»: в отличие от большинства других сердечно-сосудистых заболеваний, легочную гипертензию чаще диагностируют у женщин (от 1,4 до 5-х раз), чем у мужчин. Однако у последних прогрессирование и симптоматика заболевания развиваются гораздо быстрее и имеют более тяжелые проявления [19,20,113] ввиду чего при исследовании фармакологических агентов, нацеленных на терапевтические мишени ЛГ, необходимо учитывать возможное влияние пола, и проводить изучение их действия как на мужских, так и на женских особях.

Современные терапевтические подходы к лечению ЛГ позволяют замедлить темпы прогрессирования заболевания, однако не влияют на этиологические факторы его развития. В связи с этим легочная гипертензия тяжело поддается фармакологической коррекции, и до сих пор считается неизлечимой [20,114]. На сегодняшний день существует острая необходимость поиска новых терапевтических мишеней, лекарственных средств и подходов, связанных с молекулярными и клеточными механизмами, лежащими в основе ее патогенеза.

Значительный вклад в развитие легочной гипертензии может вносить митохондриальная дисфункция [50]. Митохондрии представляют собой энергетические станции клеток, которые выполняют ряд важных регуляторных и гомеостатических ролей, особенно в клетках сосудов и сердца, и именно они производят большое количество супероксид- и/или гидроксил-радикалов в ходе выполнения своих функций [23]. Нарушение деятельности митохондрий приводит к снижению синтеза конечного макроэрга аденозинтрифосфата (АТФ) и увеличению продукции активных форм кислорода, в связи с чем, поддержание нормальной работы этого органоида может рассматриваться как важная терапевтическая цель.

Несмотря на то, что вклад CoQ10 и селена при легочной гипертензии изучен недостаточно, существуют примеры их успешного применения при других сердечно-сосудистых заболеваниях [135,171], в связи с чем, исследование действия комбинации убихинола в новой лекарственной форме для внутривенного введения и селена на моделях ЛГ, в основе которых лежит воспаление, таких как монокроталин-индуцированная модель легочной гипертензии (МКТ-ЛГ), представляет большой интерес.

**Степень разработанности проблемы.** На кафедре фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова много лет проводятся исследования солюбилизированного CoQ10 при различных патологических состояниях. Изучена фармакокинетика CoQ10 в составе препарата Кудесан® после введения препарата крысам в дозе 30 мг/кг [18], а также используемого в данной диссертационной работе солюбилизированного препарата 1% убихинола в дозах 5, 10, 20 и 30 мг/кг [3,4,6]. Убедительные результаты получены на моделях ишемического инсульта [145] и инфаркта миокарда [5] у крыс, подтверждены вазоактивные свойства препарата в экспериментах *in vitro* [108]. При этом исследования нового препарата солюбилизированного убихинола совместно с другими фармацевтическими агентами, которые могли бы потенцировать его эффекты, не проводилось. Кроме того, все исследования были выполнены на самцах, без учета влияния пола.

**Цель диссертационного исследования:** изучить влияние препарата 1% солюбилизированного убихинола и его комбинации с селеном на степень развития легочной гипертензии, индуцированной монокроталином (МКТ-ЛГ) у самцов и самок крыс Wistar.

**Задачи исследования.**

1. Изучить эффекты препарата убихинола, вводимого внутривенно в дозе 30 мг/кг и его комбинации с селеном, на симптомы признаки развития МКТ-ЛГ: величину систолического давления в правом желудочке сердца и его гипертрофию у самцов и самок крыс стока Wistar.
2. Оценить состояние эндотелия легочных сосудов путем анализа изменений реактивности изолированных перфузируемых легочных сосудов в ответ на сосудосуживающие и сосудорасширяющие факторы у животных обоих полов с легочной гипертензией на фоне действия препарата убихинола и его комбинации с селеном.
3. Оценить состояние легких у животных с МКТ-ЛГ на фоне действия препарата убихинола и его комбинации с селеном методом магнитно-резонансной томографии (МРТ).
4. Провести анализ возможных механизмов наблюдаемых эффектов.
5. Выявить возможные половые различия в эффектах исследуемых препаратов.

**Научная новизна.** В работе впервые показаны как индивидуальные, так и сочетанные эффекты комбинации солюбилизированного убихинола при внутривенном введении и селена на развитие МКТ-ЛГ различной степени тяжести. При среднетяжелом течении МКТ-ЛГ выявлено протективное влияние убихинола на массу правого желудочка сердца, а также массу легких и их структуру у животных обоих полов.

При более тяжелой степени течения МКТ-ЛГ у самцов протективное влияние убихинола на индексы гипертрофии правого желудочка сердца не выявляется, но эффект предотвращения увеличения массы легких сохраняется. Кроме того, препарат убихинола нивелирует пол-

зависимое изменение реактивности изолированных легочных сосудов к вазоактивным факторам на фоне ЛГ разной степени тяжести.

Впервые на 4х-недельной модели МКТ-ЛГ подтверждено противовоспалительное действие убихинола – показан достоверно меньший уровень экспрессии провоспалительного маркера микроНК-34а в ткани ПЖ.

Подтверждено, что селен, вводимый внутривентрикулярно ежедневно начиная с 7 дня эксперимента, не влияет на основные параметры легочной гипертензии как у самцов, так и у самок, а также, вероятно, усугубляет структурные изменения в легких у самцов, что выражается в увеличении их массы по сравнению с массой легких самок.

Впервые установлено, что комбинация убихинола и селена препятствует увеличению систолического давления в правом желудочке сердца по сравнению с другими группами у самцов. При этом сочетание веществ достоверно снижает массу легких только у самцов, нивелируя действие одного перорально вводимого селена, выраженное в усугублении структурных изменений в легких.

**Теоретическая и научно-практическая значимость.** Впервые изучен препарат убихинола для внутривенного применения при развитии МКТ-ЛГ. Выявленный протективный эффект применения убихинола и его комбинации с селеном на животных с МКТ-ЛГ может дополнить клинические рекомендации для лечения больных с легочной гипертензией средней степени тяжести, а также для профилактики развития заболевания у людей с генетической предрасположенностью к хроническими обструктивными заболеваниями легких или временно пребывающих в гипоксических условиях. Теоретическая важность полученных данных состоит в расширении понимания механизмов действия убихинола, проявляющихся в восстановлении функции эндотелия, как одного из факторов патогенеза легочной гипертензии.

**Методология и дизайн исследования.** В представленной работе применялись физиологические, физико-химические, биохимические, гематологические и томографические методы исследования. Для воспроизведения модели легочной гипертензии проводили однократную подкожную инъекцию водно-спиртового раствора монокроталина (МКТ) в дозе 60 мг/кг. Промежуток от введения МКТ до острого эксперимента составлял от 3х до 4х недель. Содержание убихинола в плазме крови и печени определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Степень развития легочной гипертензии определяли стандартными методами: по изменению систолического давления в правом желудочке сердца и степени его гипертрофии. Для оценки состояния легких (наличия фиброзной ткани и вентилируемости) проводили магнитно-резонансную томографию. Для измерения реактивности артерий к вазоактивным факторам проводили перфузию изолированных сегментов легочных артерий сосудосуживающими и сосудорасширительными факторами. Оценивали гематологические

показатели крови, а также проводили исследование ткани правого желудочка сердца методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Все манипуляции были проведены согласно с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», а также директивы 86/609/ЕЕС.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Препарат убихинола, вводимый внутривенно в дозе 30 мг/кг, оказывает протективное влияние на степень гипертрофии правого желудочка сердца самцов и самок крыс с монокроталин-индуцированной легочной гипертензии.
2. Препарат солюбилизованного убихинола в дозе 30 мг/кг при внутривенном введении предотвращает развитие существенных фиброзных изменений и увеличение массы легких при монокроталин-индуцированной легочной гипертензии средней и тяжелой степени тяжести у самцов и самок крыс.
3. Препарат солюбилизованного убихинола в дозе 30 мг/кг при внутривенном введении на фоне развития монокроталин-индуцированной легочной гипертензии, вероятно, за счет своих противовоспалительных свойств, пол-зависимо восстанавливает эндотелий-зависимое расширение сосудов, что может быть одним из механизмов протективного действия препарата.
4. Селен в дозе 10 мкг/кг, вводимый внутривенно, не оказывает значимых положительных эффектов на развитие монокроталин-индуцированной легочной гипертензии средней тяжести ни у самцов, ни у самок, однако, его применение в сочетании с препаратом убихинола предотвращает увеличение систолического давления в правом желудочке сердца у самцов, что не наблюдается при действии одного убихинола.

**Степень достоверности данных.** Достоверность представленных в работе результатов подтверждена применением современных стандартных экспериментальных методов, статистически рассчитанной величиной выборок объектов эксперимента и их однородностью, использованием адекватных методов статистической обработки. При подготовке обзора литературы и обсуждения результатов использованы только актуальные и оригинальные литературные источники.

**Апробация результатов исследования.** Данные были представлены на заседании кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты научно-исследовательской работы были изложены на IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2019), XV Всероссийском конгрессе "Артериальная гипертензия – 2019" (Москва, 2019), VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и



Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Судак, 2019), международном конгрессе Heart Failure 2019 and the World Congress on Acute Heart Failure (Афины, 2019), международном конгрессе Heart Failure 2021 (Барселона, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 10 работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, и 6 тезисов в материалах российских и международных конгрессов и конференций.

**Личный вклад автора.** Автор непосредственно принимала участие в анализе литературных источников по теме диссертационной работы, в разработке гипотезы, планировала и проводила эксперименты, анализировала полученные результаты, участвовала в написании и публикации статей и тезисов докладов. Вклад диссертанта является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, от экспериментально-теоретической реализации поставленных задач до обсуждения результатов и написания научных публикаций.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста, где представлены введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, список литературы и благодарности. Диссертационная работа также включает 19 таблиц, 26 рисунков. Список используемой литературы содержит 215 источника, из них 195 на иностранном языке.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Характеристика CoQ10 и фармако-технологические особенности его препаратов

Коэнзим Q10 (CoQ10) представляет собой витаминоподобное соединение природного происхождения, впервые выделенное из бычьего сердца профессором Ф. Крэйном в 1957 году [7,49]. Позднее в 1978 году Питер Митчелл удостоился Нобелевской премии по химии за описание окислительного фосфорилирования с участием CoQ10 [7]. CoQ10 локализуется на внутренней мембране митохондрий и выполняет роль ключевого переносчика электронов от I к III комплексу дыхательной цепи [151]. В процессе клеточного дыхания CoQ10 связывает электроны и протоны и восстанавливается до убихинола, а высвобождая электроны и протоны – окисляется до убихинона. Известно, что около 95% CoQ10 в организме человека присутствует в виде восстановленной формы – убихинола [42]. Отношение восстановленной формы к окисленной можно рассматривать как важный показатель антиоксидантной системы - этот коэффициент у здоровых людей составляет  $3,7 \pm 1,3\%$  [8]. Обладая высоким редокс-потенциалом, убихинол выступает в роли антиоксиданта. Способность предотвращать повреждение мембранных фосфолипидов, липопротеинов и ДНК обуславливает его большую эффективность и целесообразность фармакотерапевтического применения в сравнении с убихиноном [65].

Значительная часть убихинола в организме синтезируется эндогенным путем клетками печени из мевалоната при участии витаминов группы B, пантотеновой и фолиевой кислот и некоторых других веществ [138]. Помимо эндогенного синтеза CoQ10 существует перечень продуктов, регулярное употребление которых повышает его уровень: говяжье мясо, сердце и печень, жирная рыба, нерафинированные масла и пр. [34]. После 25 лет и/или при применении некоторых лекарственных средств, ингибирующих ГМГ-КоА-редуктазу [138], способность организма синтезировать CoQ10 снижается, в связи с чем, возникает необходимость восполнения этой потребности извне [138,151].

По химической природе CoQ10 имеет сходство с витаминами E и K и представляет собой бензохинон, в 6 положении которого закреплена цепь из 10 изопреновых остатков. Вследствие большой молекулярной массы (863,34 г/моль) и чередования двойных связей в боковой цепочке растворимость CoQ10 в гидрофильных растворителях существенно снижается [35,138]. По этой причине ассортимент лекарственных средств и нутрицевтиков имеющих в составе CoQ10 представлен только пероральными формами с низкой биодоступностью (до 3% от вводимой дозы). Данный факт в значительной степени ограничивает терапевтическое применение CoQ10, а особенности структуры создают трудности в разработке лекарственной формы, предназначенной для парентерального применения [42].

На сегодняшний день применяются следующие подходы к увеличению гидрофильности CoQ10: уменьшение частиц субстанции CoQ10 до наноразмера, повышение растворимости (за счет твердой дисперсии, создания пролекарства, комплексообразования и ионизации) и использование новых носителей лекарств, таких как липосомы, микросферы, наночастицы и эмульсионные системы [35,40,193]. Однако не все способы являются эффективными т.к. большинство технологий предполагает либо губительное для легкоокисляемого убихинола применение высоких температур, либо создание большемерных частиц (более 300 нм), осложняющие проникновение убихинола в клетки, либо применение большого количества солюбилизаторов, что делает невозможным внутривенное применение препарата. Большинство из применимых подходов для создания жидкой лекарственной формы CoQ10 в качестве действующего вещества содержат убихинон (окисленную форму), что вероятно, объясняется тем, что более эффективный убихинол, является быстроокисляемым соединением [8,154].

### **Фармакокинетические и фармакодинамические свойства CoQ10**

CoQ10, будучи липофильным веществом, при пероральном приеме всасывается аналогично липидам и жирорастворимым витаминам. По этой причине для увеличения биодоступности рекомендуется принимать его препараты и БАДы совместно с пищей богатой жирами [42]. После начала переваривания пищи, в желудке происходит высвобождение CoQ10 из ее состава (при употреблении препаратов и биологических добавок этот этап не актуален). В 12-перстной кишке CoQ10 входит в состав мицелл, которые образуются из желчных кислот желчи и доставляется к месту всасывания в тонком кишечнике. Подобно витамину Е и другим липофильным веществам, после абсорбции убихинол включается в хиломикроны и по лимфатическим сосудам достигает кровяного русла [42,102]. Далее убихинол появляется в составе брыжеечных лимфатических липопротеинов, богатых триацилглицеридами. Эти частицы преобразуются липазой липопротеинов в остатки хиломикронов в циркуляторном русле и затем поглощаются печенью, где убихинол проникает преимущественно в ЛПНП и ЛПОНП и снова попадает в кровь [42,102,187]. ЛПВП также содержит небольшое количество убихинола, поэтому его концентрации сильно зависят от концентрации липопротеинов в плазме [42,187].

Как правило, относительно высокие концентрации CoQ10 содержатся в тканях с высокой энергетической потребностью или метаболической активностью, таких как сердце, почки, печень и мышцы [22,42]. Распределение и окислительно-восстановительное состояние CoQ10 в различных тканях человека показано в таблице 1 [21,42,132].

**Таблица 1.** Распределение и редокс-статус CoQ10 в различных тканях человека (адаптирована из Aberg и соавт. [21])

<b>Ткань</b>	<b>CoQ10 нмоль/г</b>	<b>Редокс-статус (% восстановления)</b>
<i>Сердце</i>	132,0	61,0
<i>Почки</i>	77,0	75,0
<i>Печень</i>	63,6	95,0
<i>Мышцы</i>	46,0	65,0
<i>Мозг</i>	15,5	23,0
<i>Стенка кишечника</i>	13,3	95,0
<i>Легкие</i>	9,2	25,0
<i>Плазма</i>	1,1	96,0

Данные о субклеточном распределении CoQ10 свидетельствуют о большой доле (40-50%) CoQ10, локализованной во внутренней мембране митохондрий, и меньшими количествами в других органеллах и цитозоле. Среди кровяных клеток лимфоциты и тромбоциты содержат значительное количество убихинола, тогда как в эритроцитах он не обнаруживается ввиду отсутствия в них митохондрий [42,132].

При изучении фармакокинетики внутривенного введения новой солюбилизированной формы препарата 1% убихинола крысам было показано, что она имеет нелинейный характер. При увеличении дозы препарата (5,10 и 20 мг/кг) было отмечено снижение клиренса и более длительное сохранение убихинола в организме, что происходит из-за уменьшения скорости желчной экскреции. При многократном внутривенном введении (5 и 10 мг) было продемонстрировано возрастание клиренса, что предполагает более эффективное пополнение тканей препаратом. Фармакокинетика и постепенное окисление убихинола в плазме крови означало активное участие препарата в эндогенных окислительно-восстановительных процессах [4].

Несмотря на то, что механизмы действия убихинола при различных заболеваниях до конца не выяснены, известно, что убихинол выполняет ряд важных в организме функций. Как уже упоминалось ранее, убихинол выступает как ключевая составляющая электрон-транспортной цепи митохондрий, необходимой для производства АТФ, и играет роль в передаче протонов на внутренней мембране митохондрий, что называют протон-индуцированным Q-циклом. Q-цикл представляет собой серию последовательных реакций окисления и восстановления CoQ10, между формами убихинона и убихинола, что приводит к свободному перемещению протонов через липидный бислой, а в случае митохондрий – через внутреннюю митохондриальную мембрану. Важно отметить, что Q-цикл неразрывно связан с дыхательной цепью переноса электронов [134].

Помимо участия в транспортной цепи электронов, убихинол может выступать в качестве антиоксиданта, защищая плазматическую мембрану от перекисного окисления [215]. В исследовании Tsai и соавт. показано, что у мышей при отсутствии аполипопротеина E и добавлении к рациону CoQ10 наблюдается явное снижение концентрации гидропероксидов липидов в атеросклеротических поражениях [188]. Как донор водорода убихинол более эффективен, чем другие антиоксиданты. Кроме того, CoQ10 способен регенерировать окисленную форму  $\alpha$ -токоферола [42].

В дополнение, существуют исследования, свидетельствующие о противовоспалительных свойствах убихинола. В эксперименте Diaz-Castro, J и соавт., где на фоне интенсивной тренировки спортсменов, провоцирующей воспалительную реакцию в мышцах, убихинол способствовал выработке противовоспалительных цитокинов, таких как антагонист рецептора IL-1(IL-1ra) и IL-10 и уменьшал выработку IL-8, IL-1, IL-15, MCP-1 и TNF- $\alpha$  [55]. В другом эксперименте *in vitro* на культуре эндотелиальных клеток убихинол способствовал увеличению экспрессии miR-146a – противовоспалительного фактора [148].

Старение и развитие различных патологических процессов ведут к снижению уровней убихинола в тканях, с чем связывают развитие таких заболеваний и состояний как гипертония, атеросклероз, дислипидемия, диабет, мышечная дистрофия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. [83,86].

### **Эффекты применения CoQ10 при заболеваниях сердечно-сосудистой системы**

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания являются самой частой причиной преждевременной смертности как в России, так и во всем мире. Согласно данным ВОЗ, около 17,5 миллионов человек ежегодно умирают вследствие различных сердечно-сосудистых патологий [25,157]. Ведущими факторами риска являются возраст, пол, генетическая предрасположенность, повышенное артериальное давление, дислипидемия, метаболические заболевания, гиподинамия, вредные привычки и др. [157].

Среди перечня биологических добавок и лекарственных препаратов, предназначенных для дополнительной терапии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний особое место занимает CoQ10 [110,148]. CoQ10 является необходимым для сердечной мышцы веществом: согласно литературным данным, три из четырех кардиологических пациентов имеют низкий плазменный уровень CoQ10 [42,110]. Было также отмечено, что уровень CoQ10 в плазме крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и дилатационной кардиомиопатией значительно ниже, чем у здоровых. В зависимости от тяжести сердечной травмы уровень циркуляции CoQ10 снижается прямо пропорционально прогрессированию заболевания [188,110]. В связи с этим

существует несколько теорий о роли действия CoQ10 при сердечно-сосудистых патологиях: антиоксидантная, противовоспалительная и энергетическая.

Отмечено, что одной из главных причин провоцирующих развитие заболеваний сердца выступает оксидативный стресс [110]. Активные формы кислорода вызывают серьезные повреждения клеточных мембран и ДНК [110,215]. Продукты оксидативного стресса и цитокины провоцируют увеличение размеров кардиомиоцитов, приводя к гипертрофии миокарда [121,215]. CoQ10 в его восстановленной форме убихинола способен эффективно подавлять свободно-радикальное окисление, что выражается в снижении уровня малондиальдегида, и увеличении уровней таких антиоксидантных ферментов как глутатион-пероксидаза, супероксид-дисмутаза, каталаза и некоторых других. Так, в работе Tiano и соавт. по определению эффекта CoQ10 при пероральном приеме в дозе 100 мг/день пациентами с ишемической болезнью сердца на эндотелий-зависимую вазодилатацию коронарных артерий, было показано, что в группе, принимавшей CoQ10, уровень внеклеточной супероксид-дисмутазы и эндотелийзависимое расширение были значительно выше, чем в группе плацебо [185].

Благодаря своему антиоксидантному свойству, CoQ10 увеличивает биодоступность и пролонгирует действие эндотелий-зависимого расширительного фактора – оксида азота [78]. Окисление NO до пероксинитрита – одного из самых агрессивных факторов окислительного стресса, сопровождается нарушением работы многих ферментативных систем и сопровождается сужением сосудов, изменением баланса синтеза и действия вазоконстрикторов и вазодилататоров, что выступает звеном в патогенезе артериальной гипертензии [57]. Увеличение NO-зависимого расширения при действии убихинола было подтверждено также результатами работы Козаева и соавт., где было продемонстрировано увеличение эндотелий-зависимого расширения изолированных колец аорты здоровых крыс после их инкубации с убихинолом [108].

Другим возможным механизмом протективного действия CoQ10 считается его противовоспалительная способность, поскольку повышение уровня провоспалительных цитокинов и молекул адгезии является прямым следствием оксидативного стресса [192]. Однако не до конца ясны механизмы, посредством которых это свойство реализуется. По-видимому, CoQ10 может играть роль в снижении продукции провоспалительных цитокинов путем ингибирования экспрессии гена NF-κB [163,165], ослабления модуляции микроРНК-146a и IL-1 рецептор-ассоциированной киназы [148] и снижения секреции макрофагального воспалительного протеина-1 альфа и регулируемых при активации нормальных Т-клеток экспрессируемых и секретируемых факторов [164]. Считается, что повышение уровня адипонектина при использовании CoQ10 [57] может косвенно привести к снижению

воспалительных факторов, таких как TNF- $\alpha$ . В ряде исследований наблюдалась отрицательная связь между адипонектином и факторами воспаления (TNF- $\alpha$ , IL-6, hs-CRP) [57,213]. Zhou и соавт. сообщили, что адипонектин может подавлять стимулированные моноциты, секретирующие TNF- $\alpha$  [213].

Существует также предположение, что инфаркт миокарда может быть связан с снижением выработки энергии в митохондриях [110]. CoQ10 играет большую роль в энергетических потребностях сердца: является основным компонентом в транспорте электронов, необходимых для производства АТФ, а процесс сокращения сердца, включающий высвобождение Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулаума и последующей активации сократительных белков [103]. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, употреблявших добавку CoQ10 в средней дозе 200 мг/сутки отмечалось уменьшение симптомов усталости и одышки предположительно вследствие активизации биоэнергетики сердечной мышцы. Кроме того, средняя толщина межжелудочковой перегородки и средняя толщина задней стенки значительно уменьшились [115]. Наблюдалось также значительное снижение тяжести болезни по классу NYHA (классификация выраженности хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации) и повышение качества жизни [22].

Показано влияние CoQ10 при пероральном приеме в дозе 200 мг на липидный профиль у пациентов, перенесших инфаркт миокарда: было отмечено увеличение содержания в плазме крови антиатерогенных липопротеинов высокой плотности [139]. Имеются данные о влиянии CoQ10 на состояние свертывающей системы крови: назначение 100 мг CoQ10 дважды в сутки в течение 20 дней приводило к трехкратному повышению общего уровня CoQ10 и было ассоциировано с торможением экспрессии рецепторов витронектина на тромбоцитах и уменьшение их размера, а также снижением уровней фибронектина в плазме крови (-20,2%), тромбксана В2 (-20,6%), простаглицина (-23,2%) и эндотелина-1 (-17,9%) [139,169,215].

Опыты Иванова А.В., Городецкой Е.А., Калениковой Е.И. и соавт. подтверждают, что внутривенное введение CoQ10 (убихинона) в дозе 30 мг/кг через 10 мин после окклюзии коронарной артерии достоверно уменьшает площадь некроза, а также постинфарктную гипертрофию левого желудочка, [98] и, по-видимому, улучшает выживаемость клеток миокарда в момент ишемии [101].

Считается, что снижение плазменного уровня CoQ10 можно расценивать как предиктор смертности у пациентов с сердечной недостаточностью [141]. Сопоставимость уровня смертности и концентрации CoQ10 была достоверно выше, чем таковая у другого маркера – мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP). Также, CoQ10 оказывает инотропное

действие на сердечную мышцу, улучшая сердечный выброс за счет увеличения ее биоэнергетических функций и утилизации кислорода на клеточном уровне [76].

На моделях вирусного миокардита у мышей было показано, что применение внутривентрикулярной инъекции CoQ10 за день до и на 12 день после вирусной инъекции увеличивает выживаемость и уменьшает тяжесть состояния. У людей сочетанное применение CoQ10 и антиангинальным препаратом – триметазидином продемонстрировали синергетическое (потенцированное) влияние на увеличение фракции выброса и снижение оксидативного стресса [107].

В опытах с диабетической кардиомиопатией у мышей было установлено, что хроническое пероральное введение CoQ10 снижает диабетическую диастолическую дисфункцию левого желудочка, гипертрофию кардиомиоцитов, фиброз и апоптоз, а также экспрессию предсердного натрийуретического пептида, фактора роста соединительной ткани, провоспалительных медиаторов и тяжелой цепи  $\beta$ -миозина [51,96].

Нельзя не отметить необходимость применения CoQ10 при лечении и профилактики атеросклероза ингибиторами ГМГ-коэнзима-редуктазы (статины), в особенности для пожилых людей. Как известно путь биосинтеза холестерина и CoQ10 имеют общего предшественника и синтезируются из мевалоната, в связи с чем статины, блокируют синтез не только холестерина, но и снижают концентрацию CoQ10 приблизительно на 40% через снижение уровня ферментов фенилпируфосфата [64]. На фоне дефицита CoQ10 проявляются побочные эффекты статинов: повышенный уровень креатинкиназы, миопатия, дерматомиозит и рабдомиолиз [53,125], а также ускоренное прогрессирование катаракты [178]. Таким образом, был сделан вывод о том, что во избежание миопатических побочных эффектов лучше применять статины одновременно с приемом CoQ10. Позднее в исследовании Skarlovnik и соавт. было установлено, что статины обладают хорошим эффектом и меньшим количеством побочных эффектов, когда используются в сочетании с CoQ10 [178].

Интересным в контексте нашего исследования является наблюдение, проводимое шведскими специалистами на протяжении пяти лет, которое показало, что пероральный прием комбинации селена с CoQ10 более чем в два раза снижает риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у пожилых людей. Было замечено, что в группе, принимающей вещества, уровень маркера NT-proBNP значительно ниже, что указывает на меньшие риски развития сердечной недостаточности [27]. Наблюдение в течение последующих четырех лет отметило высокое качество жизни этих пациентов и снижение времени госпитализации в сравнении с группой плацебо. Более того, через десять лет, продолжительность жизни в группе, принимавшей во время исследования селен и CoQ10, была на 46% выше, несмотря на отсутствие нутрицевтиков в рационе [33].



Впоследствии было проведено дополнительное изучение эффектов комбинации селена и CoQ10 у пожилых людей с низким селеновым статусом в течение 36 месяцев. В нем была оценена концентрация двух маркеров - PAI1 (ингибитор активации плазминогена 1) и VWF (фактор Виллебранда). Значительно более низкий уровень обоих маркеров был продемонстрирован в группе, принимавшей комбинацию CoQ10 и селена. По мнению автора, эти результаты говорят о снижении воспаления и оптимизации функции эндотелия сосудов [28]. На сегодняшний день это самое большое исследование эффекта комбинации селена и CoQ10, что делает ее перспективной для дальнейшего изучения, в том числе на моделях воспалительного характера, таких как легочная гипертензия.

### **Эссенциальность селена и его распространение. Селеновый статус**

Селен является незаменимым микроэлементом для обеспечения здоровья человека. Данный факт впервые был продемонстрирован в экспериментах Schwartz и Foltz в 1957 г, в которых у животных, употреблявших в пищу обеднённую селеном пищу, развивались несовместимые с жизнью некротические поражения печени [167]. Для сохранения нормального функционирования органов и их систем необходимый уровень содержания селена в крови должен составлять не менее 115-120 мкг/л крови [2].

Селен входит в ряд важных ферментов, таких как глутатионпероксидазы, тиоредоксинредуктазы, йодтирониндейодиназы и некоторых других функциональных селенопротеинов. Большинство из них выполняет роль донора электронов в окислительно-восстановительных реакциях, йодтирониндейодиназа участвует в превращении неактивного гормона щитовидной железы тироксина (Т4) в активный 3-йодотиронин (Т3) [186,205].

На сегодняшний день выделено и функционально описано около 25 селенопротеинов [205]. В отличие от металлических микроэлементов, взаимодействующих с белками в виде кофакторов, селен как металлоид (не металл) котрансляционно интегрирован в полипептидную цепь в составе аминокислоты [88]. Метаболическое значение ферментов, содержащих в активном центре атом селена, основано на более высокой нуклеофильности селена и том, что в отличие от меркапто-группы в цистеиносодержащих ферментах, радикал селенола полностью ионизирован при физиологическом pH, благодаря чему селенсодержащие ферменты обладают гораздо более высокой реакционной способностью [13,39].

В России по данным эпидемиологических исследований умеренный селенодефицит имеет место на всем протяжении страны [13]. О выраженном дефиците селена следует говорить при концентрации селена в крови менее 50 мкг/л крови [16]. Умеренный селенодефицит понижает фертильность мужчин и женщин, вызывает нефропатии и неврологические отклонения, а недостаточность селена может привести к сердечно-сосудистым патологиям,

способствовать прогрессированию СПИДа и гепатита В и появлению злокачественных опухолей [15]. Наиболее серьезные последствия дефицита селена для сердечно-сосудистой системы в виде развития кардиомиопатии Кешана были отмечены на значительной территории Китая, а также в Центральной и Восточной Сибири. Причиной этому послужило недостаточное поступление этого микроэлемента в рацион питания, индивидуальные кулинарные вкусы различных социальных групп или изменения в привычках питания [16].

### **Биологические свойства различных форм селена и его фармакокинетика**

В организм селен поступает с водой (10%) и пищей растительного и животного происхождения (90%) [16]. Наибольшее количество селена содержится в бразильских орехах, морепродуктах, мясе и злаках. Однако даже достаточное поступление селена с продуктами питания не может гарантировать необходимый уровень обеспеченности организма и зависит от биодоступности, что определяется природой его химической формы [13,15,16,39,59,88]. В зерновых культурах и других растениях содержится в основном селенометионин. В мясе животных наиболее вероятной формой считается селенцистеин [17].

Неорганические селениты и селенофосфаты легче всасываются путем простой диффузии, но органические формы обладают наилучшей биоусвояемостью. Процесс всасывания селенсодержащих молекул происходит преимущественно в двенадцатиперстной кишке и завершается в дистальном отделе тонкой кишки. Считается, что усвоение селена потенцируют такие витамины как А, Е и С и др. [15,16].

В организме селенат- и селенит-анионы быстро восстанавливаются ферментативным путем до селеноводорода, присутствующего при физиологических значениях рН, в основном в виде гидроселенид-аниона [13]. Некоторое количество образующегося селеноводорода быстро связывается с транспортными белками за счет нестойких ковалентных или вандерваальсовых связей, образуя лабильный («обмениваемый с селенитом») пул селена [13]. Избыточные количества селеноводорода медленно подвергаются ферментативному метилированию с образованием, последовательно, метилгидроселенида (Se-замещенное производное метанола), диметилселенида и катиона триметилселенония. Эти соединения селена экскретируются с мочой [88], а диметилселенид – в больших количествах также и с потом [168].

Органические формы селенометионин и селеноцистеин позволяют микроэлементу в 35 раз активнее включаться в процессы обмена веществ в организме [13]. Они всасываются в неизменном виде путем вторичного активного транспорта, подобно аминокислотам. Далее восстанавливаются до селенида водорода, который выступает донором селена для построения различных селенопротеинов, причем, в первую очередь синтезируются функционально наиболее важные селенопротеины, или же селен превращается в метилселенид-анион и

выводится из организма [13]. Однако селенометионин является хорошим источником селена для синтеза специфических селенопротеинов только в том случае, когда организм достаточно обеспечен серой в составе метионина. Включение селеноцистеина в тканевые белки вместо цистеина зависит от обеспеченности организма серой так же, как и включение селенометионина. Часть селеноцистеина деселенируется с образованием либо селенита [13], либо селеноводорода под действием зависимой от витамина В6 селеноцистеин-лиазы [168].

Доказано, что применение органических соединений селена приводит к увеличению его концентрации в плазме даже у людей с относительно высоким Se статусом [182], что говорит о его нерегулируемом и неспецифическом включении в альбумины и другие белки почти в неограниченных количествах.

Селен может депонироваться в различных органах и тканях. Наибольшие концентрации наблюдаются в почках, так как это основной орган экскреции селена, чуть меньше содержится в печени и поджелудочной железе, за которыми следуют сердечная и скелетная мускулатура [182].

Значительное количество метаболитов соединений селена (50–60%) выделяется с мочой. У женщин экскреция селена через мочевыводящие пути значительно выше, чем у мужчин, что указывает на гендерный диморфизм биосинтеза селенопротеинов [182].

### **Значение дефицита селена для сердечно-сосудистой системы**

При недостаточном потреблении селена с пищей происходит снижение синтеза селенсодержащих ферментов, главным образом глутатион-пероксидаз, тирозиноредуктаз и некоторых других селенопротеинов, обладающих антиоксидантными свойствами, что влечет за собой развитие ряда серьезных патологий.

В исследовании Espinola Klein и соавт. было установлено, что низкий уровень цитозольной глутатионпероксидазы в эритроцитах значительно повышает риск инфаркта миокарда до 36,9% [58]. А эксперименты Yoshida и соавт. доказали, что мыши с отсутствием генов, кодирующих синтез глутатионпероксидаз, сильнее реагируют на состояния ишемии/реперфузии, чем не подвергшийся генетическим изменениям контроль, что выражается в развитии большей площади некроза миокарда [207].

Ardanaz и соавт. выявили, что у мышей с врожденным отсутствием глутатионпероксидазы в сравнении с положительной группой контроля при хроническом действии ангиотензина II провоцирующего окислительный стресс, наблюдались увеличение массы сердечной мышцы и гипертрофия левого желудочка. В этом эксперименте была продемонстрирована линейная зависимость между активностью глутатионпероксидазы и

выживаемостью животных в условиях оксидативного стресса, что говорит о протективной функции селеносодержащих ферментов [34].

Кроме того, селен в составе глутатионпероксидазы может снизить выработку макрофагами воспалительных простагландинов и лейкотриенов за счет нейтрализации пероксидных промежуточных продуктов, и тем самым уменьшать процесс воспаления [99]. Повышение селенового статуса оказывает антитромботическое действие при взаимодействии тромбоцитов и эндотелиальных клеток путем стимулирования глутатионпероксидазы через механизм, не связанный с биосинтезом метаболитов NO. Показано, что индуцированная NO-синтаза в иммуностимулированных макрофагах ингибируется амино-этил-изоселеномочевинной и родственными соединениями, предупреждая появление свободного нитроксильного радикала [37].

Ярким примером связи недостаточности потребления селена является болезнь Кешана – эндемичная кардиомиопатия, которая впервые была выявлена в китайской провинции Хэйлунцзян. На территории России заболевание встречается в Забайкальском крае, Бурятии, Якутии и Амурской области. Клинические формы коррелируют с содержанием селена в плазме крови (исследована плазма детей) и подразделяются на острую ( $11,35 \pm 0,28$  мкг/л), хроническую ( $32,4 \pm 0,28$  мкг/л) и латентную ( $51,2 \pm 0,86$  мкг/л). Заболевание характеризуется увеличением размеров сердца и легких за счет фиброзной ткани, аритмиях, фокальных некрозах и последующей сердечной недостаточности, а также высокой летальностью [14]. Исследования показали, что необходимым компонентом для развития заболевания является заражение энтеровирусом типа Coxsackievirus B<sub>3</sub> [38].

Детальный анализ патогенеза заболевания с использованием экспериментальных моделей на мышах с нормальным и сниженным содержанием селена в рационе, а также нокаутных мышей без глутатионпероксидазы, показал, что вирус coxsackievirus B<sub>3</sub> (CVB<sub>3</sub>/0), в норме не вызывающий развитие миокардита у животных с нормальным содержанием селена, вызывает миокардит у животных с селенодефицитом. В сердце последних обнаруживается в 10-100 раз больше вирусных частиц по сравнению с контрольными животными. Кроме того, было доказано, что при размножении вируса у селенодефицитных мышей, он мутирует и становится значительно более патогенным [38].

Таким образом, поддержание приема селена, направленного на поддержание адекватного уровня глутатионпероксидазы, может быть, одним из ключевых факторов, предупреждающих развитие атеросклероза, инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, а также поможет предотвратить морфологические изменения сердечной мышцы.

При недостаточности тиоредоксинредуктазы – фермента имеющего активный селеносульфидный сайт, нарушается репарация таких ферментов как рибонуклеотид-редуктаза

или пероксиредоксин – тип пероксидазы тиоредоксина. Тиоредоксинредуктаза также восстанавливает низкомолекулярные соединения и является ключевым ферментом метаболизма селена [44]. Эффекты, опосредованные работой тиоредоксинредуктаз направлены на репарацию других ферментов, уменьшая последствия оксидативного стресса в том числе в миокарде.

Отдельно выделяют и функциональные селенопротеины. Считается, что селенопротеин К активно синтезируется именно в сердечной мышце и выполняет антиоксидантные функции преимущественно в клетках миокарда [123]. Дефект селенопротеина S может увеличивать риск возникновения заболеваний сердца, в частности у женщин. Популяционное исследование FINRISK показало, что вероятность развития ишемической болезни сердца у носительницы минорных аллелей гена SEIS возрастает в два раза, а также существует в 3 раза больший риск возникновения ишемического инсульта [26]. Селенопротеин Р (SeP), который считается самым многочисленным селенсодержащим белком и основным переносчиком селена к периферическим тканям. Он представляет собой единственный белок, содержащий больше одного атома селена и по некоторым данным их число доходит до 10, однако это количество не постоянно, так как SeP выступает донором атомов селена для других селенозависимых ферментов и циркулирует в крови в виде изоформ. SeP состоит из двух доменов, где большой N-концевой домен содержит 1 остаток селеноцистеина, ответственный за редокс-свойства, а меньший C-концевой домен содержит остальные 9 остатков. SeP синтезируется преимущественно в печени, но существует и в клетках, которые способны к его воспроизведению в других органах. Помимо транспортных обязанностей он сам обладает антиоксидантными свойствами, предотвращая повреждения клеток, что подтверждает эксперимент Rock, C и соавт., где *in vitro* методом флуоресцентного анализа была показана способность SeP предотвращать появление гидропероксидов липидов мембран, генерируемых липооксигеназой [156].

В актуальном шведском исследовании была показана связь между низкой концентрацией SeP в крови с риском возникновения и повышенной смертности от сердечно-сосудистых заболеваний: в период с 2002 по 2006 г. была собрана и проанализирована плазма 4366 жителей шведского города Мальмё обоих полов, не имеющих в анамнезе сердечно-сосудистых патологий. Наибольшее количество смертельных случаев как по различным причинам, так и по причине болезней сердца было зафиксировано в группе с наименьшим содержанием SeP (0,4–4,3мг/мл), в то время как среди людей с высоким содержанием SeP (5,9–6,9мг/мл) наблюдалась наименьшая смертность. Такое же распределение было отмечено и в случае возникновения первого сердечно-сосудистого события. Кроме того, испытуемые с дефицитом SeP были подвержены значительно большему риску возникновения ишемической болезни сердца и инсульта [166].

Однако не все исследования подтверждают протективное значение SeP для сердечно-сосудистой системы. Kikuchi и соавт. провели большую работу, в ходе которой микроматричный анализ первичной культуры клеток гладкой мышцы сегментов легочной артерии, взятой во время операции по трансплантации легких у больных с ЛГ, выявил 32-кратное увеличение экспрессии гена, кодирующего молекулу SeP в сравнении с клетками, полученными от здоровых людей, и носило прогностический характер, так как высокий уровень данного параметра соответствовал более тяжелому течению заболевания. Кроме того, была установлена корреляция между повышенным уровнем SeP в гладкой мышце легочных сосудов и увеличением давления в правом желудочке сердца у каждого из больных ЛГ [104-106]. Но несмотря на масштабность работы Kikuchi и соавт, вопрос о применении селена у больных ЛГ не рассматривался, что делает перспективными дальнейшие исследования.

Установлено, что дефицит селена может также повысить риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и с помощью других механизмов. При дефиците селена происходит нарушение синтеза простациклина, что ведет к увеличению синтеза тромбаксана, повышается агрегационная способность тромбоцитов. Понижение концентрации селена в крови может спровоцировать прогрессирование атеросклероза и увеличение окклюзии артерий при ишемической болезни сердца за счет изменения взаимодействия между макрофагами, нейтрофилами и тромбоцитами [130].

Исследование Zamani Moghaddam соавт., выполненное на модели цыплят бройлеров показало, что через 5 недель ежедневного потребления наноселена, добавленного в кормовые смеси в дозе 0,3 мг/кг, наблюдается достоверное уменьшение гипертрофии правого желудочка сердца (ПЖ/масса сердца) и ослабление симптомов ЛГ. Механизмы, лежащие в основе этого, включают снижение перекисного окисления липидов в печени, иммуномодуляцию и улучшение морфологии кишечных ворсинок [135].

Согласно имеющимся данным, включение селена в состав антиоксидантной терапии имеет важное значение для снижения риска, смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Зачастую селен комбинируют с цинком, медью, витамином Е и др., однако как уже говорилось ранее ввиду последних исследований особый интерес представляет его сочетание с CoQ10. О взаимосвязи этих веществ свидетельствует работа Vadhanavikit и соавт., в которой у крыс с индуцированным диетой селенодефицитом наблюдалось достоверное снижение уровня CoQ10 в сердце и печени в сравнении с контролем [191]. Это подтверждает и выдвинутая гипотеза Reido том, что синдром внезапной детской смерти тесно связан с недостаточностью селена. В результате селенодефицита снижается функция щитовидной железы, повреждаются митохондрии клеток сердечной мышцы и электронный транспорт, происходит снижение синтеза эндогенного CoQ10. Все это приводит к развитию дегенеративных заболеваний сердца

и кардиомиопатии. По-видимому, селен, защищая клетки от оксидативных повреждений, поддерживает способность митохондрий кардиомиоцитов синтезировать эндогенный CoQ10 и поддерживать клеточное дыхание [155].

### **Легочная гипертензия. Диагностика и классификация**

Среди патологий сердечно-сосудистой системы особое место занимает (ЛГ), которая представляет собой группу разнородных по патогенезу заболеваний, характеризующихся стойким повышением артериального давления в легочной артерии и гипертрофией правого желудочка сердца. ЛГ характеризуется возрастанием сопротивления в легочных сосудах, их ремоделированием и перегрузкой правого желудочка сердца, вследствие чего развивается его гипертрофия. Гемодинамические и структурные изменения могут привести к появлению правожелудочковой, а затем и левожелудочковой сердечной недостаточности существенному снижению качества жизни и преждевременной смерти пациентов [36,68,203].

В норме среднее лёгочное артериальное давление у здоровых мужчин и женщин составляет 14-20 мм рт. ст. При развитии ЛГ средняя величина давления в лёгочной артерии достигает значений более 25 мм рт. ст. в покое и более 30 мм рт. ст. при нагрузке [190]. Клиническая картина часто сочетает несколько симптомов: одышку, слабость, повышенную утомляемость, и отёки [72,190]. Ввиду малой специфичности симптомов, для точной диагностики заболевания требуется проведение инструментального обследования пациента [72].

С помощью метода электрокардиографии (ЭКГ) можно диагностировать наличие гипертрофии правого желудочка – одного из главных признаков развития ЛГ (около 87%) [19,20,72,155]. Однако, отклонения на ЭКГ исследовании более вероятны при тяжелой степени ЛГ. К отклонениям на ЭКГ могут относиться Р пульмональ, отклонение оси вправо, гипертрофия правого желудочка, блокада правой ножки пучка Гисса и удлинение комплекса QRS и угла QRS-T, что указывает на тяжелое заболевание [36].

Другим информативным и неинвазивным методом является магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца и легких. При диагностике легочной гипертензии с помощью МРТ оценивают состояние и функции преимущественно правого желудочка, хотя в последнее время рекомендуют обращать внимание и на состояние левого желудочка и перегородки [190]. Несмотря на то, что сложная геометрия правого желудочка несколько затрудняет изучение его количественных параметров, на МРТ изображениях сердца человека можно оценить гипертрофию правого желудочка относительно других зон сердечной мышцы, конечные систолический и диастолический объемы, ударный объем, фракцию выброса и некоторые другие, в том числе гемодинамические параметры [190]. В экспериментах подтверждена

исключительная важность измерения фракции выброса правого желудочка, так как этот параметр является прогностическим при оценке степени заболевания и продолжительности жизни пациентов. Давление в правом желудочке можно оценить при использовании контрастного вещества, однако, расчетные величины не всегда коррелируют с полученными, при катетеризации правого желудочка [72,190].

Легочная гипертензия может являться как причиной, так и следствием легочного фиброза: известно, что на начальной стадии ЛГ фиброз диагностируется менее чем у 10% больных идиопатическим легочным фиброзом (ИФЛ), однако с прогрессированием фиброза частота присоединения ЛГ возрастает до 32-50%. Своевременная и качественная диагностика с помощью МРТ имеет приоритетное значение [24]. С помощью стандартных (31P), а также модифицированных (19F) методов МРТ можно оценить степень фиброзного поражения легких, а также их перфузируемость [176,177].

Кроме того, при подозрении на ЛГ проводят обязательный анализ крови для определения уровня специфических антител к ядерным антигенам (anti-nuclear antibodies), а также специфических маркеров, например, NT-proBNP и др. [68].

Катетеризация правых отделов сердца проводится для подтверждения диагноза ЛГ. Данная диагностическая процедура оценивает реактивность лёгочных сосудов в ответ на блокаторы кальциевых каналов (вазореактивный тест) [19,20,68,158,203]. Для оценки сосудистой реактивности также используются NO и простагландин I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>): ответ на перечисленные агенты характеризуется снижением среднего лёгочного артериального давления более чем на 10 мм рт. ст. [158,203].

Современная классификация ЛГ ВОЗ, утвержденная на II Всемирном симпозиуме по проблеме ЛГ в г. Эвиане (Франция) в 1998 году, выделяет пять групп в соответствии со схожестью клинической картины, патофизиологическими данными, гемодинамическими характеристиками и подходом к лечению (таб.2) [203].

**Таблица 2.** Клиническая классификация лёгочной гипертензии [19,20].

Тип	Подтипы
Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ)	1.1. Идиопатическая ЛАГ. 1.2. Генетически обусловленная ЛАГ: 1.2.1. Генотип с мутацией в гене BMPR2; 1.2.2. Другие мутации. 1.3. ЛАГ вследствие приема лекарств или токсинов. 1.4. ЛАГ, ассоциированная с: 1.4.1. Заболеваниями соединительной ткани;



	<p>1.4.2. ВИЧ –инфекцией;</p> <p>1.4.3. Портальной гипертензией;</p> <p>1.4.4. Врождённые пороки сердца;</p> <p>1.4.5. Шистосомозом.</p>
Веноокклюзионная болезнь легких и/или легочный капиллярный гемангиоматоз	<p>1.1 Идиопатическая.</p> <p>1.2 Генетически обусловленная:</p> <p>1.2.1 Генотип с мутацией в гене EIF2AK4;</p> <p>1.2.2 Другие мутации.</p> <p>1.3 ЛАГ вследствие приема лекарств или токсинов;</p> <p>1.4 ЛАГ, ассоциированная с:</p> <p>1'.4.1 Заболеваниями соединительной ткани;</p> <p>1'.4.2 ВИЧ –инфекцией.</p>
Легочная гипертензия, ассоциированная с заболеваниями левых отделов сердца	<p>2.1. Систолическая дисфункция желудочка сердца;</p> <p>2.2. Диастолическая дисфункция левого желудочка;</p> <p>2.3. Клапанные пороки;</p> <p>2.4. Врожденная и приобретенная обструкция выносящего тракта/кардиомиопатия;</p> <p>2.5. Врожденный/приобретенный стеноз легочных вен.</p>
Легочная гипертензия вследствие заболевания легких и/или гипоксии	<p>3.1. Легочная гипертензия при ХОБЛ;</p> <p>3.2. Легочная гипертензия при интерстициальных заболеваниях легких;</p> <p>3.3. Легочная гипертензия при прочих легочных заболеваниях, сопровождающихся признаками рестрикции и обструкции;</p> <p>3.4. Расстройства дыхания во время сна;</p> <p>3.5. Легочная гипертензия при альвеолярной гиповентиляции;</p> <p>3.6. Легочная гипертензия вследствие пребывания в высокогорье;</p> <p>3.7. Легочная гипертензия вследствие аномалии развития легких.</p>
Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия и другие формы обструкции легочной	<p>4.1. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия;</p> <p>4.2. Другие формы обструкции легочной артерии:</p> <p>4.2.1. Ангиосаркома;</p> <p>4.2.2. Другие внутрисосудистые опухоли;</p> <p>4.2.3. Артерииты;</p>

артерии	4.2.4. Врожденный стеноз легочной артерии; 4.2.5. Паразитарное поражение.
Легочная гипертензия неясного и/или многофакторного происхождения	<p>5.1. Легочная гипертензия при гематологических заболеваниях – хронической гемолитической анемии, миелопролиферативных заболеваниях, спленэктомии.</p> <p>5.2. Легочная гипертензия при системных заболеваниях – саркоидозе, легочном гистиоцитозе, лимфангиолейомиоматозе.</p> <p>5.3. Легочная гипертензия при метаболических расстройствах – гликогеновых заболеваниях, тиреодных, болезни Gaucher.</p> <p>5.4. Другие случаи легочной гипертензии: опухоли, приводящие к обструкции легочной артерии, фиброзирующий медиастенит, хроническая почечная недостаточность.</p>

### Этиология и патогенез легочной гипертензии

Отсутствие точных эпидемиологических данных затрудняет оценку распространенности легочной гипертензии, однако по современным представлениям, заболеваемость ЛГ составляет около 1% от общей численности населения в мире, и 10% среди лиц в возрасте старше 65 лет [87]. Интересно отметить, что у женщин в репродуктивный период жизни реже обнаруживаются гипертония и ишемическая болезнь сердца, чем у мужчин того же возраста [143]. При этом количество случаев обнаружения ССЗ у женщин в постменопаузу сравнивается с показателями для мужчин [149]. Согласно имеющимся статистическим данным, ЛГ до 4 раз чаще страдают женщины вне зависимости от основной причины, повлекшей развитие ЛГ. Однако продолжительность жизни женщин, с момента постановки диагноза гораздо длиннее, чем у мужчин с аналогичным диагнозом [10,94].

Сравнительно меньшую тяжесть проявления ЛГ у женщин связывают с протективными эффектами эстрадиола, превалирующего полового гормона в организме женщины. Эстрадиол оказывает положительное влияние на морфологию правого желудочка, а также ослабляет проапоптотическую передачу сигналов, окислительный стресс, цитоплазматический гликолиз и активацию провоспалительных цитокинов [66]. Известно, что эстрадиоловые рецепторы определяют половой диморфизм структуры легких у мышей и крыс, что важно при изучении легочной гипертензии т.к. легкие являются ключевым звеном патогенеза ЛГ. Половые различия реализуются через оба эстрадиоловых рецептора: увеличение количества альвеол

реализуется через ER $\alpha$ , а уменьшение альвеолярного размера как через ER $\alpha$ , так и через ER $\beta$  [129]. Эти данные согласуются с тем, что снижение диффузионной способности легких у женщин до 47 лет с возрастом происходит медленнее, чем у мужчин, а при достижении менопаузы, показатели сравниваются [144]. Ввиду того, что эффекты фармакологических агентов для терапии легочной гипертензии могут отличаться вследствие различия гормональных систем, крайне важно при изучении действия проводить эксперименты на животных обоих полов [133].

Причины развития ЛГ весьма разнообразны: основными факторами являются длительное пребывание в гипоксических условиях, наличие патологий легких, таких как хроническая обструктивная болезнь и идиопатический фиброз, оксидативное повреждение клеток и воспаление, а также генетическая предрасположенность. Нередко возникновение легочной гипертензии является следствием сочетания разных факторов [199].

Ряд исследований подтверждает, что оксидативный стресс играет ключевую роль в патогенезе различных форм ЛГ и может являться триггером ее развития [131,174,196,202]. Отмечено, что у людей с ЛГ значительно увеличивается экспрессия маркеров окислительного стресса, нарушаются структура и метаболизм клеток миокарда и легочных сосудов [54]. Увеличение количества реактивных форм кислорода (АФК), изменение окислительно-восстановительного состояния и повышенный оксидативный стресс были продемонстрированы в легких и ПЖ нескольких моделей ЛГ, включая хроническую гипоксию, токсическое действие монокроталина, нокаутную мышиную модель caveolin-1 и трансгенную крысу Ren2, которая сверхэкспрессирует мышинный ген ренина [54]. Генерация АФК в этих моделях происходит в основном за счет активности НАДФ-оксидазы, ксантинооксидазы и эндотелиальной NO-синтазы. По мере прогрессирования заболевания циркулирующие моноциты и моноцитарные клетки-предшественники из костного мозга, мигрируют и накапливаются в легочном сосудистом русле. После появления эти воспалительные клетки генерируют АФК и выделяют митогенные и фиброгенные цитокины, которые вызывают пролиферацию клеток и фиброз в сосудистой стенке, приводящих к прогрессирующему ремоделированию сосудов [54].

При хронической форме ЛГ характерные морфофункциональные изменения носят преимущественно воспалительный характер и включают процессы апоптоз-устойчивой пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток лёгочной артерии. Воспалительный процесс в эндотелиальных клетках повреждает и увеличивает проницаемость эндотелиального слоя [161,184]. В нормальных физиологических условиях эндотелий регулирует тонус и структуру сосудов и реализует антикоагулянтные, антиагрегантные и фибринолитические функции. Вследствие воспаления происходит дисбаланс между продукцией вазодилатирующих и вазоконстрикторных факторов, а также изменение чувствительности сосудов к ним.

Развивается дисфункция эндотелия, из-за чего снижается синтез эндотелий-релаксирующего фактора – оксида азота (NO) [71,197] и простациклина [48] при одновременной избыточной выработке тромбоксана-A<sub>2</sub> и эндотелина-1 [48,63]. Длительная сосудистая вазоконстрикция способствует утолщению стенок сосудов малого круга за счет пролиферации и гипертрофии различных клеток с последующим ремоделированием сосудистой стенки. Наблюдается повышение лёгочного сосудистого сопротивления и давления в правой части камер сердца с компенсаторным разрастанием ткани правого желудочка [63].

Высвобождение хемотаксических веществ из поврежденных клеток эндотелия при развитии ЛГ приводит к миграции гладкомышечных клеток из меди в интиму легочных артериол. Секреция вазоконстрикторных и прокоагуляторных медиаторов приводит к развитию тромбоза *in situ*, изменяя состояние легочного сосудистого русла из обычного изокоагулянтного состояния в прокоагулянтное. В результате повреждение эндотелия прогрессирует и приводит к нарастанию сосудистой обструкции и облитерации, и далее к снижению кровотока и оксигенации крови в легких [160]. Таким образом, предупреждение процессов сосудистого ремоделирования и улучшения функций эндотелия является одной из целей при разработке терапевтических подходов к лечению ЛГ.

### **Экспериментальные модели для изучения легочной гипертензии.**

#### **Механизм развития монокроталин-индуцированной легочной гипертензии**

Современная лекарственная терапия обеспечивает значительное улучшение симптоматического статуса пациентов и замедление темпов клинического ухудшения. Несмотря на это, ЛГ остается хроническим заболеванием, плохо поддающимся лечению, и по-прежнему существует необходимость выявления и терапевтического воздействия на другие значимые патогенные клеточные и молекулярные сигнальные механизмы. Концепции о патофизиологии ЛГ в последние годы перешли от первоначальных о влиянии давления и скорости потока к современным о взаимодействия между клетками [93] и устойчивости к апоптозу [119]. В настоящее время не существует адекватной экспериментальной модели, которая была бы сопоставима с ЛГ у человека. Тем не менее, исследование возможных экспериментальных моделей ЛГ позволяет идентифицировать различные клеточные изменения, посредством которых можно изыскать новые терапевтические мишени для фармакологических агентов. В экспериментальной фармакологии наиболее часто используемыми моделями ЛГ у животных являются гипоксическая, SuHx, а также монокроталин-индуцированная модели [180].

Гипоксическая форма легочной гипертензии моделируется с помощью хронического воздействия нормобарической, либо гипобарической гипоксии. Модель проста в исполнении, легко воспроизводима и отражает изменения, которые происходят у человека, длительно

пребывающего в высокогорье, страдающего обструктивными заболеваниями дыхательных путей или ночными апноэ. Хроническая гипоксия вызывает структурный ремоделинг, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток (ГМК) малых лёгочных сосудов, о чём свидетельствует увеличение содержания  $\alpha$ -актина в ГМК [180]. Помимо этого, гипоксия вызывает развитие воспалительной реакции в лёгочных артериолах, что также вносит свой вклад в ремоделирование всех слоёв сосудистой стенки и в конечном итоге приводит к стойкой вазоконстрикции [181]. Однако, данная модель применима в большей степени для крыс, чем для мышей: большая вазоконстрикция легочных сосудов у крыс в ответ на гипоксию связана с изменением экспрессии генов, у крыс при гипоксических условиях в большей степени экспрессируются гены, ответственные за пролиферацию эндотелия и апоптоз [89]. Несмотря на очевидные плюсы данной модели, гипоксическая модель не полностью воспроизводит изменения, развивающиеся у людей [52,73].

SuHx модель легочной гипертензии основана на блокаде рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R) ингибитором тирозинкиназы - SU5416 в сочетании с хронической гипоксией. Модель отражает многие важные особенности легочной гипертензии у человека и характеризуется серьезными ангио-облитеративными изменениями в легочных сосудах [52]. Однако, данный метод влечет развитие тяжелой формы легочной гипертензии, на фоне которой не всегда возможно оценить эффективность веществ, имеющих молекулярные мишени [52,180,202].

Монокроталин-индуцированная модель ЛГ (МКТ-ЛГ) является наиболее распространённой [74,180]. Монокроталин (МКТ) представляет собой пирролизидиновый алкалоид, выделенный из растения *Crotalaria spectabilis* [74,11]. После попадания в кровь монокроталин метаболизируется в печени при помощи цитохрома P-450 (CYP3A4) [11,201] до пневмотоксичного монокроталин-пиррола, который связывается с эритроцитами в зависимости от парциального давления кислорода в крови. Метаболит агрегируется на эндотелиальных клетках легочной артерии, вызывая дисфункцию эндотелия [11,74,201]. Lee и соавт. показали, что в эндотелиальных клетках легочной артерии (РАЕС), подвергшихся воздействию МКТ, развивается мегалоцитоз, характеризующийся увеличением аппарата Гольджи, снижением работы эндотелиальной NO-синтазы и уровня оксида азота [118]. Эндотелиальные клетки, обработанные МКТ, демонстрируют выраженные нарушения внутриклеточных мембранных процессов, которые затрагивают ряд белков клеточной мембраны [201]. Huang и соавт. сообщили, что вызванная МКТ потеря мембранных белков приводит к активации пролиферативных и антиапоптотических факторов [90].

Начальное повреждение эндотелиальных клеток, вызванное МКТ, также связано с дисфункцией рецептора ангиогенеза – костного морфогенетического белка II (BMPR II) и с

повышенной экспрессией внутриклеточных элементов, участвующих в секвестрации и ингибировании его активности [122]. Показано, что активация данного рецептора связана со стимуляцией транскрипционных факторов Smad, однако могут быть активированы и другие внутриклеточные сигнальные каскады. Дисрегуляция BMP-сигнализации ассоциирована с сосудистыми заболеваниями, включая легочную гипертензию и атеросклероз. МКТ не только повреждает легочные артерии, но и вызывает альвеолярный отек, гиперплазию клеток альвеолярной перегородки и окклюзию легочных вен [74].

В результате повреждения клеток МКТ-пирролом происходит увеличение синтеза провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  [11,45,201,204], а также одного из ведущих факторов фиброгенеза – фактора роста соединительной ткани (CTGF) [11,45], что ведет к формированию рубцовой ткани в легких, гипертрофии легочной артерии и ткани правого желудочка сердца. МКТ-индуцированный интерстициальный фиброз легких был описан у мышей (в различных дозах и временных точках) [11,204]. Hayashi и др. сообщили, что однократной дозы в 100 мг/кг достаточно [84], чтобы вызвать тяжелый фиброз легких и/или интерстициальную пневмонию у мышей, в то время как другие исследователи сообщили, что фиброз легких, по-видимому, является лишь поздним проявлением воздействия МКТ [56].

Таким образом, по своей этиологии и патофизиологическим проявлениям ЛГ, вызываемая МКТ, близка к первичной ЛГ у людей, но не вызывает сильных обструктивных поражений интимы сосудов легких. В отличие от гипоксической модели, при МКТ ЛГ гипертрофия медиэластических и мышечных легочных артерий не сопровождается пролиферацией, а мускуляризация интерстициальных мелких артерий происходит более медленно [56]. МКТ-индуцированная модель ЛГ обеспечивает повторяемость результатов, воспроизводимость и подразумевает ряд изменений, которые теоретически могут скорректировать CoQ10 и селен.

Исходя из всего вышеизложенного, **целью настоящего исследования** явилось изучение эффектов солюбилизованного убихинола, предназначенного для парентерального применения, и/или перорально вводимого порошка органического селена на основные показатели развития монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс Wistar, а также выявление половых различий в действии изучаемых веществ.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. изучить эффекты препарата убихинола, вводимого внутривенно в дозе 30 мг/кг и его комбинации с селеном, на симптомы признаки развития МКТ-ЛГ: величину систолического давления в правом желудочке сердца и его гипертрофию у самцов и самок крыс стока Wistar;
2. оценить состояние эндотелия легочных сосудов путем анализа изменений реактивности изолированных перфузируемых легочных сосудов в ответ на сосудосуживающие и

сосудорасширяющие факторы у животных обоих полов с легочной гипертензией на фоне действия препарата убихинола и его комбинации с селеном;

3. оценить состояние легких у животных с МКТ-ЛГ на фоне действия препарата убихинола и его комбинации с селеном методом магнитно-резонансной томографии (МРТ);
4. провести анализ возможных механизмов наблюдаемых эффектов;
5. выявить возможные половые различия в эффектах исследуемых препаратов.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе кафедры фармакологии (заведующий кафедрой - д.м.н., профессор О.С. Медведев) факультета фундаментальной медицины и на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета (заведующий кафедрой - д.б.н., профессор А.А. Каменский) ФГБОУ ВО МГУ имени М.В.Ломоносова

### Животные и их содержание

Объектом исследования были самцы и самки крыс стока Wistar (вес 180–230 г), полученные из вивария НИИ общей патологии и патофизиологии (г. Москва, Россия). Все манипуляции с животными осуществлялись согласно принципам Директивы 86/609/ЕЭС и руководству по содержанию и использованию лабораторных животных. Крысы содержались в стандартных виварных условиях 12-часового светового дня, со свободным доступом к воде и пище при постоянном контроле за влажностью и температурой. Все крысы выдерживали обязательный карантин: исследование начинали не ранее, чем через неделю после транспортировки животных. Для минимизации стрессовых реакций при проведении контактных манипуляций животных предварительно приручали к рукам.

### Исследуемые препараты

Препараты изготовлены АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Директор М.Н. Макарова, г. Санкт-Петербург (номер патента: RU2635993-C1):

1. Убихинол, 1% водный раствор, флакон 20 мл. состав на 1 мл: 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;
2. Растворитель (плацебо раствора убихинола); состав на 1 мл: 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. Селен, таблетки 100 мг (Solgar, США); состав на 1 таблетку: L-селенометионин – 100 мкг, кальций – 80 мг, кальция фосфат – 346,2 мг, фосфор – 60 мг.



### Общая схема экспериментов

Ввиду существования полового диморфизма в патогенезе легочной гипертензии работа была разделена на два основных блока: эксперименты на самцах и на самках. Так как тяжесть легочной гипертензии зависит от длительности наблюдения, для решения поставленных задач было проведено 4 самостоятельных эксперимента, длительность трех из которых составляла 3 недели (два на самцах, один на самках) (рис.1, рис.3), и один проводился в течение 4 недель (рис.2) от момента инъекции до острой фазы физиологического эксперимента. Все эксперименты имели одинаковую структуру. В каждом блоке были изучены гендерные особенности течения патологии, а также индивидуальные и совокупные эффекты изучаемых веществ. Всего было задействовано 225 животных: 165 самцов и 60 самок крыс Wistar.

На самках и самцах эксперимент проводили в течение 3 недель т.к. сочли этот срок оптимальным с точки зрения тяжести заболевания и возможной эффективности изучаемых веществ. За неделю до инъекции монокроталина дважды у животных измеряли вес и плетизмографическое давление в хвостовой артерии, на основании чего формировали исходно сопоставимые группы контроля (Контроль) и остальных животных, которые впоследствии подвергались подкожному введению МКТ. Все группы были сопоставимы по массе и значениям среднего систолического давления. В среднем длительность эстрального цикла самок составляет 4-5 дней, поэтому в экспериментах на самках дополнительно фиксировали фазу полового цикла в течение как минимум 9 дней до начала эксперимента. Данная манипуляция проводилась для того, чтобы унифицировать момент инъекции монокроталина и проводить ее в день 1 диэструса во избежание влияния эстрадиола на измеряемые показатели. Фазу цикла устанавливали у всех самок ежедневно на протяжении всего эксперимента.

В первый день эксперимента животных взвешивали и рассчитывали: для контрольной группы – объем водно-спиртовой смеси (группа Контроль), для остальных животных – дозу МКТ в составе водно-спиртовой смеси (60 мг/кг). Далее осуществляли подкожную инъекцию согласно группе.

На 7-ой день эксперимента всех животных взвешивали и плетизмографически измеряли систолическое давление в хвостовой артерии, эти же манипуляции повторялись на 14 и 21 дни эксперимента. Крысам из группы Контроль вводили в хвостовую вену растворитель сопоставимый с рассчитанным для данной массы объемом препарата 1% раствора убихинола 30 мг/кг (3 мл/кг). Во избежание исходных различий внутри МКТ-групп, на основании измерений массы и среднего систолического давления также формировали сопоставимые группы: 1.МКТ-Растворитель (3 мл/кг, в/в), 2.МКТ-Убихинол (30 мг/кг, в/в), 3.МКТ-Se (10 мкг/кг внутрь, ежедневно), 4.МКТ-Se-Убихинол (10 мкг/кг внутрь ежедневно и 30 мг/кг в/в, соответственно).

Растворитель и убихинол вводили в хвостовую вену. Повторно внутривенное введение проводили на 14 день.

В последнем эксперименте с селеном у самок проводили МРТ-исследование легких на 20 день эксперимента.

На 22 день все животные вступали в фазу острого физиологического эксперимента, в ходе которого под уретановым наркозом (1,2г/кг) им имплантировали катетеры – в бедренную артерию и в правый желудочек сердца, после чего прямым методом измеряли среднее системное давление, частоту сердечных сокращений и систолическое давление в правом желудочке. После декапитации животного изымали внутренние органы для последующей морфометрии.

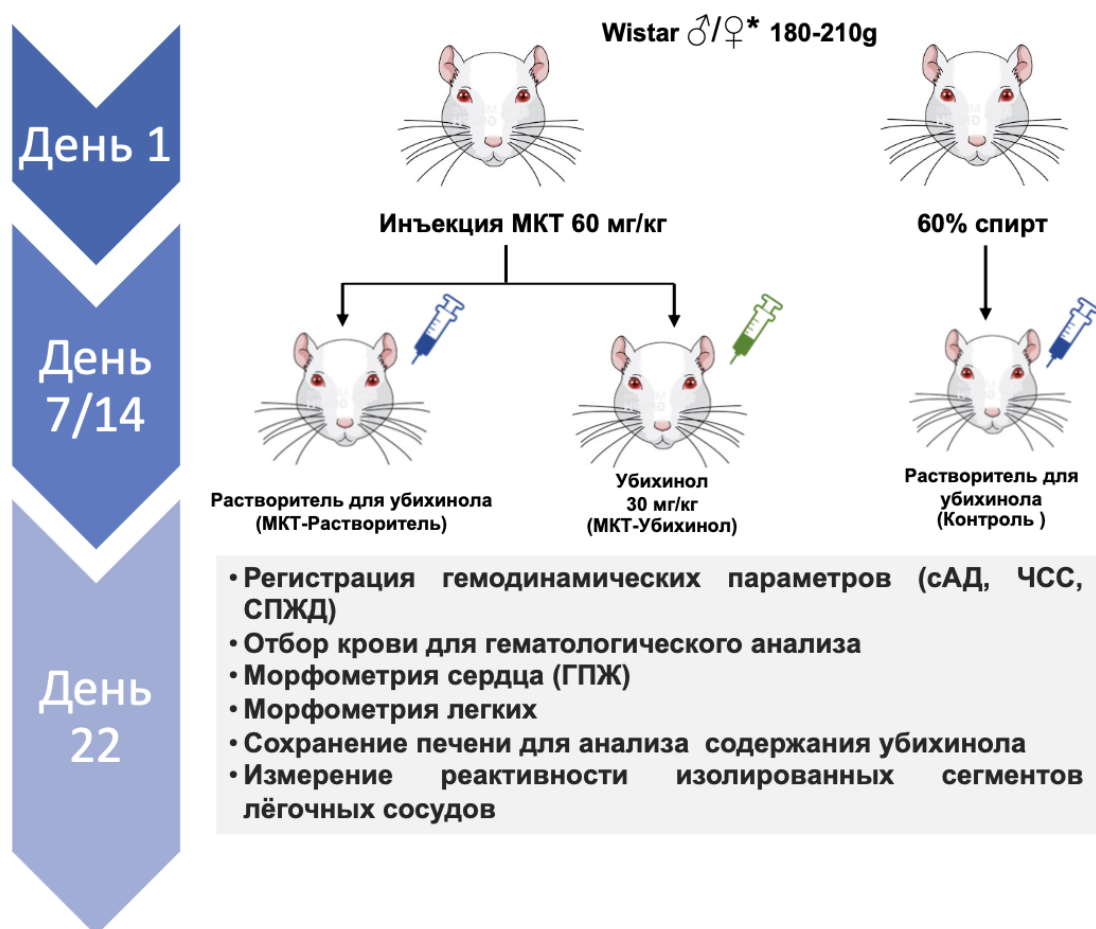


Рис. 1 Схема эксперимента по изучению эффектов 1% препарата солюбилизованного убихинола на 3х-недельной модели МКТ-индуцированной ЛГ у самцов и самок крыс

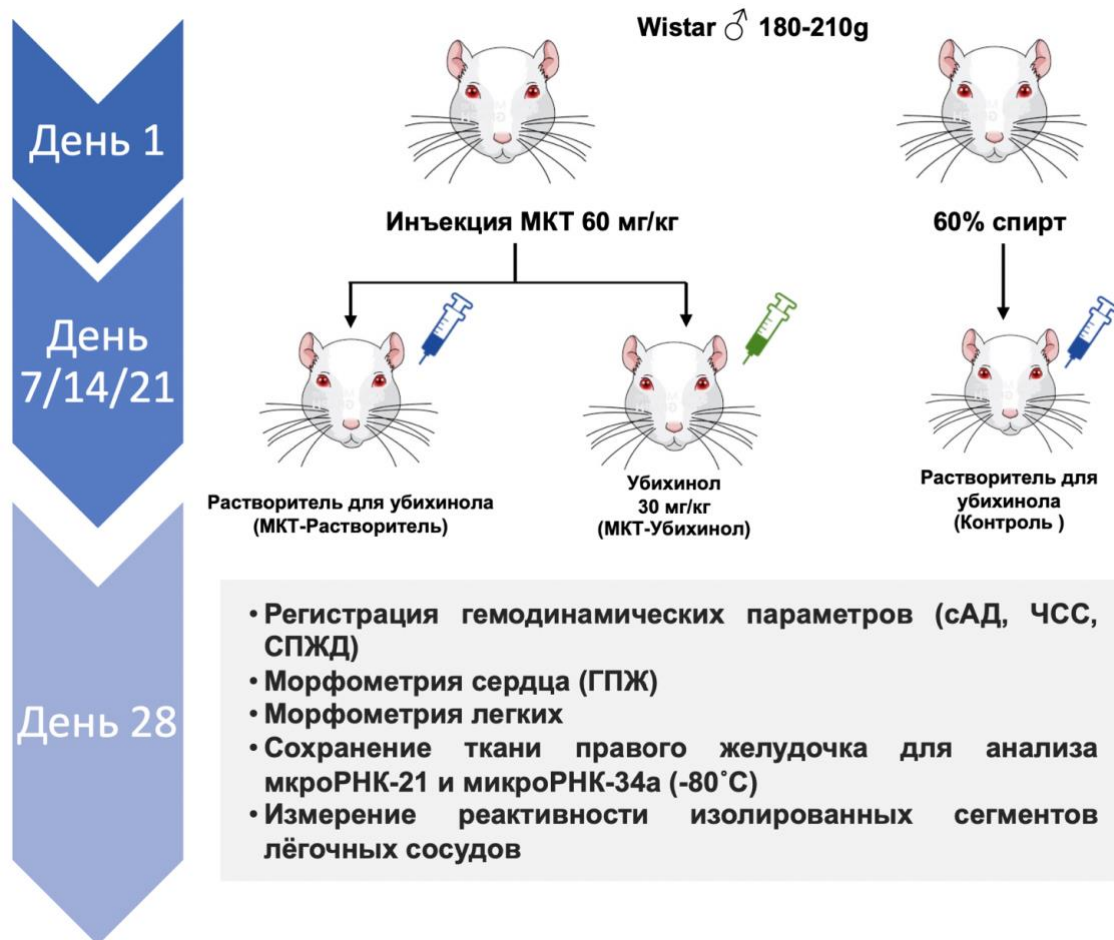


Рис. 2 Схема эксперимента по изучению эффектов 1% препарата солюбилизированного убинола на 4х-недельной модели MKT-индуцированной ЛГ у самцов крыс

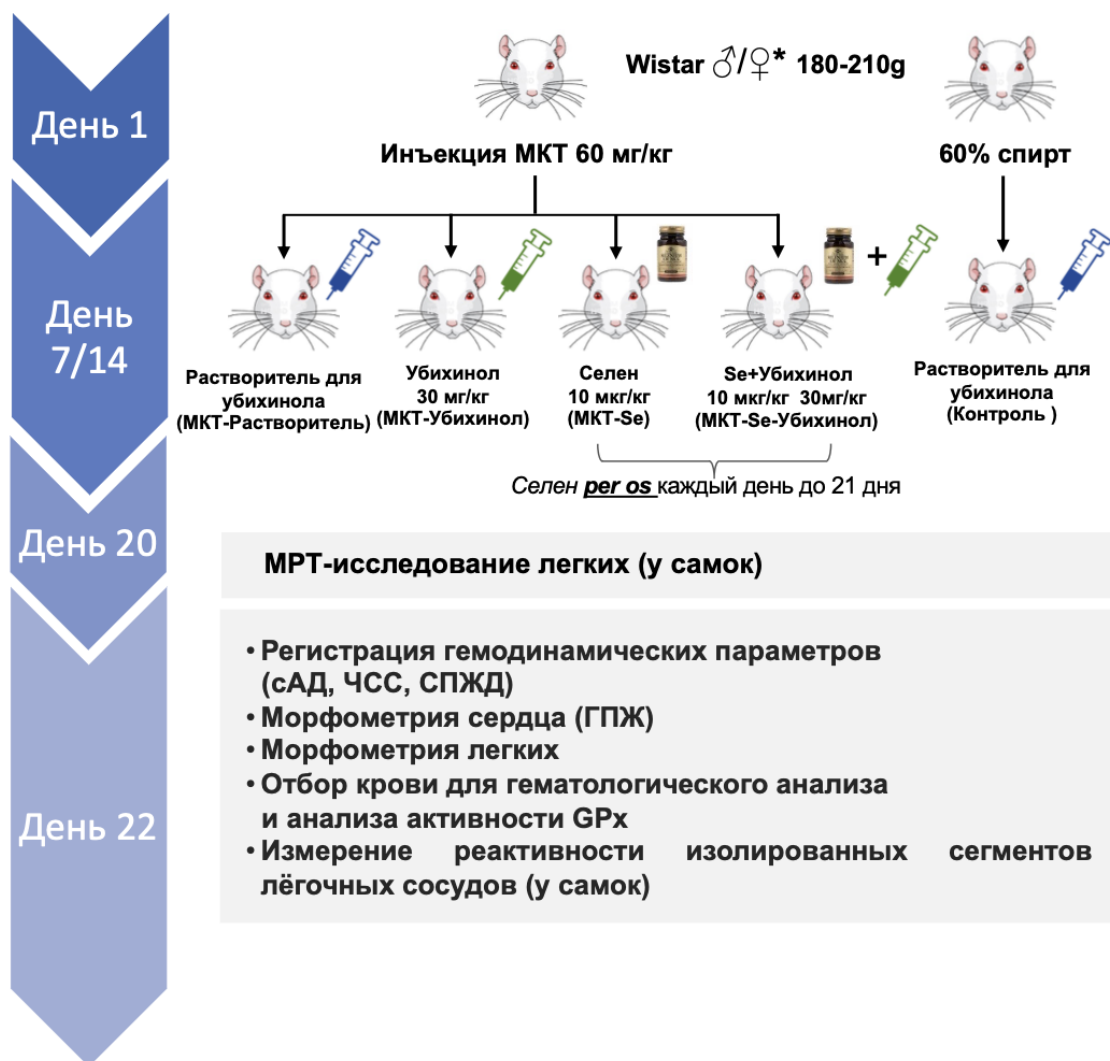


Рис. 3 Схема эксперимента по изучению эффектов 1% препарата солюбилизированного убинола и селена на 3х-недельной модели MKT-индуцированной ЛГ у самцов и самок крыс

Выбор используемой дозы убинола осуществляли на основании предыдущего опыта изучения препаратов убинола. На кафедре фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова проведены подробные исследования фармакокинетики препарата 1% солюбилизированного убинола при различных путях введения и его эффектов на таких патологических моделях как острый инфаркт миокарда и ишемический инсульт в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг вводимых внутривенно [5,6,98,145]. Так как MKT-ЛГ развивается стремительно и трудно поддается фармакологической коррекции, было решено использовать максимальную из изученных доз, при применении которой ранее была отмечена наибольшая эффективность.

Доза селена была выбрана исходя из того, что в экспериментах на животных используется широкий диапазон доз селена для перорального применения [82,189], однако при превышении физиологической потребности селен является высокотоксичным [153]. В связи с

тем, что дозы, рассчитанные на средний вес крысы 200-300 г, чрезвычайно малы, а вводимое количество легко передозировать, была выбрана доза 10 мкг/кг.

### **Манипуляции in vivo**

#### **Взвешивание животных и измерение систолического давления в хвостовой артерии**

Взвешивание и измерение среднего систолического артериального давления в хвостовой артерии начинали за неделю до введения животных в эксперимент и проводили как минимум дважды. Для того, чтобы минимизировать стресс при измерении давления, с момента поступления животных в комнату передержки животных приучали к рукам путем ежедневного помещения животного в руку, а затем на сгиб локтя. Данные массы и систолического давления использовали с целью формирования однородных групп. Плетизмографический метод измерения давления является неинвазивным, что позволяет фиксировать АД у одного животного многократно.

В ходе эксперимента в каждой серии измерение массы и АД с хвоста проводили еженедельно: на 0 день (до включения в эксперимент и разделения на группы), 1, 7, 14 и 21 дни в 3х-недельных экспериментах (рис.1, рис.3), и дополнительно на 28 день в 4х-недельном эксперименте (рис.2).

Массу измеряли на электронных весах фирмы Scatlett SC-KS57P99, предварительно поставив на весы чашу и тарировав ее вес. Затем помещали животное в чашу и ждали несколько секунд для установления точного значения.

Далее перед измерением АД животное помещали на 5 мин в индивидуальный бокс на грелке т.к. при комнатной температуре скорость кровотока в хвостовой артерии низкая. Для регистрации АД животное помещали в рестрейнер, на основание хвоста надевали окклюзионную манжету, соединенную с манометром и резиновой грушей. Давление в манжете нагнетается воздухом до значения, при котором кровоток в хвостовой артерии прекращается. Затем, давление затем медленно снижается до уровня, при котором появляется пульсовая волна, что соответствует значению систолического АД.

#### **Определение фазы цикла у самок**

Манипуляции начинали как минимум за 9 дней и продолжали на протяжении всего эксперимента, чтобы сформировать календарь для каждого животного. Мазок брали путем введения небольшого количества изотонического раствора натрия хлорида во влагалище и затем осторожно собирали раствор обратно в шприц, после чего переносили на стекло и под

бинокляром по форме клеток определяли фазу цикла. Инъекцию МКТ проводили в фазу диэструса, когда возможные протективные эффекты эстрадиола минимальны.

### **Моделирование легочной гипертензии**

Приготовление 60% водно-спиртового раствора из 98% спирта и дистиллированной воды осуществляли согласно алкоголиметрической таблице 3 ГФ XIII «Объёмные количества воды, добавляемые к 1 л спирта известной концентрации для получения заданной крепости спирта от 30 до 90% (о/о)». Отмеряли жидкости с помощью мерных цилиндров, спирт добавляли к воде при температуре в помещении 20°C.

На торсионных весах (TECHNIPROTT) отвешивали рассчитанное количество монокроталина из расчета 60 мг/кг (Sigma Aldrich, Германия), перемещали его в пробирку марки Eppendorf, после чего добавляли водно-спиртовой раствор из расчета 0,9 мл/300 г массы. Интенсивно взбалтывали в закрытой пробирке до полного растворения. При необходимости, нагревали помещая теплую воду, встряхивали, визуально оценивали раствор на наличие частиц порошка, повторяли процедуру и затем остужали до комнатной температуры и вводили подкожно в 3 места на спине.

### **Введение веществ и отбор крови**

- ***Подкожное введение монокроталина***

Для подкожного введения вещества животное помещали на ровную поверхность. Крысу фиксировали одной рукой, накрывали голову полотенцем и прижимали к столу. Кожу собирали большим и указательным пальцем. В образовавшуюся складку близко к ее основанию и параллельно телу вводили иглу. Для предупреждения попадания в кровеносный сосуд проводили аспирацию. Затем медленно вводили вещество, которое должно было идти легко (затруднение введение свидетельствовало о смещении иглы внутрь кожи.), под пальцами чувствовалась игла и вводимый объем вещества (не более 0,3 мл в одну точку). Инъекцию осуществляли инсулиновым шприцом с иглой 26G в три разных места на спине: на холке и на спине симметрично над задними лапами.

Группам контроля вводили только водно-спиртовой раствор, без МКТ.

- ***Введение раствора убихинола или растворителя в хвостовую вену***

Введение веществ осуществлялось на 7, 14 и 21 дни в зависимости от длительности эксперимента. Перед проведением процедуры крыс помещали в пластиковый бокс с опилками, находящийся на поверхности нагревателя, благодаря чему в боксе повышалась температура и животные согревались. Данная манипуляция проводилась для облегчения попадания иглы в вену. Для обеспечения быстрого и нетравмирующего отбора крови крыс фиксировали в пластиковых домиках-рестрейнерах со свободным хвостом. Для

предотвращения инфицирования хвост дезинфицировали кожным антисептиком. Перевернув рестрейнер набок находили хвостовую вену и вводили иглу 26G фиксируя левой рукой хвост. При попадании в вену в шприце появлялась капля крови, после чего начинали плавное введение. При правильном проведении манипуляций и попадании в вену введение должно осуществляться легко. После завершения иглу изымали, зажимая место введения дезинфицирующей салфеткой и держали до прекращения кровотечения.

- ***Внутрижелудочное введение веществ***

Внутрижелудочное введение веществ осуществляли ежедневно в группах МКТ-Se и МКТ-Se-Убихинол начиная с 7 дня эксперимента. Для проведения процедуры животное помещали на ровную поверхность и аккуратно собирали левой рукой кожу на холке, таким образом, чтобы кожа на уровне шеи была зажата между указательным и большим пальцем. После фиксации животного в руке через рот вводили зонд №14, который был соединен со шприцом, в котором находилась суспензия с заранее взвешенным порошком селена с дистиллированной водой. Медленно проводили по задней стенке пищевода. При правильном проведении процедуры продвижение зонда не встречает препятствий и животное не испытывает неприятных ощущений. После введения содержимое шприца выпрыскивается в желудок и зонд медленно вынимают.

- ***Отбор крови из хвостовой вены***

Отбор крови из кончика хвоста осуществлялся на 22 день после начала эксперимента. Перед проведением процедуры крыс помещали в пластиковый бокс с опилками, находящийся на поверхности нагревателя, благодаря чему в боксе повышалась температура и животные согревались. Данная манипуляция проводилась для облегчения попадания в вену. Для обеспечения быстрого и нетравмирующего отбора крови крыс фиксировали в пластиковых домиках-рестрейнерах со свободным хвостом. Для предотвращения инфицирования хвост дезинфицировали кожным антисептиком, для обеспечения притока крови – опускают ниже уровня тела животного. Отбор крови осуществляли шприцом 1 мл с иглой 26G, через которые предварительно пропустили раствор гепарина (5000МЕ/мл, РУП "Белмедпрепараты", Беларусь). Перевернув рестрейнер набок находили хвостовую вену и вводили иглу фиксируя левой рукой хвост. При попадании в вену в шприце появлялась капля крови, после чего медленно оттягивали поршень на себя, заполняя шприц. После завершения иглу изымали, зажимая место введения дезинфицирующей салфеткой и держали до прекращения кровотечения. Сняв иглу со шприца, помещали кровь в пробирку с каплей гепарина на стенке. Для отделения плазмы центрифугировали по протоколу 4500 об/мин в течение 5 минут на центрифуге (Eppendorf, Mini spin).

### Проведение 1H и 19F МРТ-исследования легких

Крысы были анестезированы 12% раствором хлоралгидрата из расчета 300 мкг хлоралгидрата на 1 кг веса животного (раствор вводился внутривенно), после чего крысы интубировались с помощью интубационной системы с подсветкой BioLITE (BRAINTREE SCIENTIFIC). При этом в качестве интубационной трубки использовались внутривенные катетеры 18G (диаметр – 1,3 мм). Затем крыса помещалась в МРТ сканер и подключалась к системе доставки газа – рис. 4 [1].

*Система доставки газа в легкие крысы:* Система доставки газовых смесей представлена на рис. 3. Для приготовления дыхательных смесей использовался пластиковый шар объемом 60 л, заполненный на 20 % кислородом с помощью кислородного концентратора Atmung LFY-I-3A и на 80 % соответствующим газом (ОФЦБ). Этот шар подключался к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ, Rodent Ventilator) с помощью резиновой трубки диаметром 5 мм. От ИВЛ отходят 2 трубки того же диаметра, одна из которых подает газ крысе в режиме синхронизации с дыханием, другая отводит выдыхаемый крысой воздух. По последней (рециклинговой) трубке выдыхаемый крысой газ можно подавать обратно в шар, что позволяет уменьшить расход газа. Установочные параметры ИВЛ выбирались так, чтобы дыхание крысы с применением аппарата ИВЛ максимально соответствовало ее собственному дыханию под действием анестезии хлоралгидратом. Таким образом, дыхательный объем задавался в количестве 3,5-4,5 мл, а частота дыхания составляла 50–60 вдохов в минуту [11].

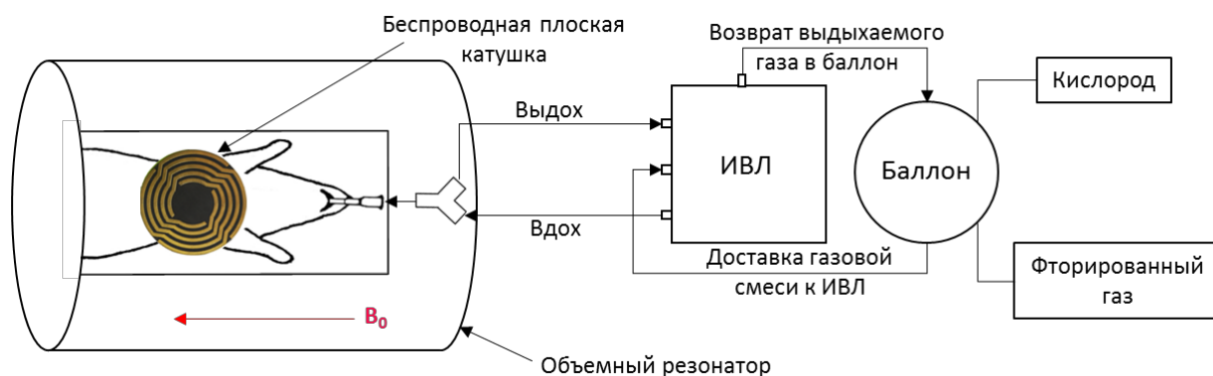


Рис. 4. Расположение крысы в МРТ системе для *in vivo* экспериментов [11]

МРТ сканирование: Изображения получали с помощью импульсной последовательности 3D UTE (ultra-short echo time или последовательность с ультракоротким временем эхо). Для получения 19F изображений задавали следующие параметры сканирования: область сканирования =  $10 \times 10 \times 10$  см<sup>3</sup>, размер матрицы =  $64 \times 64 \times 64$  (1.6 мм изотропное разрешение), TR (время повторения) = 8 мс, TE (время эхо) = 200 мкс, FA (угол отклонения намагниченности) = 55°, полоса пропускания = 25 кГц, количество накоплений = 3, полное время сканирования = 5



мин 7 с. Для получения 1Н изображений задавали следующие параметры сканирования: область сканирования =  $7 \times 7 \times 7$  см<sup>3</sup>, размер матрицы =  $156 \times 156 \times 156$  (0,45 мм изотропное разрешение), TR = 8 мс, TE = 14 мкс, FA = 3°, полоса пропускания = 50 кГц, количество накоплений = 2, полное время сканирования = 20 мин 20 с.

*Постобработка полученных данных:* МРТ изображения получались с помощью фирменных ресурсов в ParaVision 5.1, а для последующей их обработки – компоновки, проекционных преобразований, объемных реконструкций – применялся программный пакет ImageJ. С помощью этой программы определялось значение SNR для полученных МРТ изображений по формуле  $SNR = (S - N) / \sigma_N$ , где  $S$  и  $N$  – средняя интенсивность сигнала на МРТ изображении от фантома/легких и шума, соответственно,  $\sigma_N$  – среднее отклонение от сигнала шума. ЯМР спектры получались в TopSpin 2.1, а расчеты времен релаксации на основе полученных спектров проводились в Dynamic Center [11].

### **Регистрация гемодинамических параметров**

Важным диагностическим параметром развития легочной гипертензии является возрастание давления в правом желудочке сердца. Для регистрации гемодинамических параметров проводили вживление катетеров. Для этого наркотизированное животное помещали на хирургический столик и фиксировали. Сперва катетер вводили в бедренную артерию и начинали запись ср.АД и ЧСС. Начав запись, преступали к введению катера в ПЖ.

Для прямого измерения систолического давления в правом желудочке сердца (СПЖД) вводили катетер PE-50 в яремную вену крысы под уретановым наркозом (1,2г/кг), кончик катетера для этой манипуляции предварительно нагревали, путем помещения в горячую воду и придания ему загнутой формы. Крысу поворачивали головой к себе. Удаляли шерсть над правой ключицей. Далее разрезали кожу около 1 см по направлению от ключицы к голове параллельно срединной линии тела. Аккуратно разделяли пинцетами жировую ткань и мышечный слой. Выделяли участок яремной вены длиной 1 см. На краниальный конец выделенного участка вены накладывали лигатуру 4-0, после чего перевязывали ее. Под каудальный конец выделенного участка сосуда подкладывали вторую лигатуру. После чего сосудистыми ножницами делали разрез в дистальной трети выделенного участка артерии и вводили в надрез губки сосудистого пинцета, расширяли их и вводили кончик яремного катетера, предварительно заполненного стерильным физиологическим раствором с гепарином (10 ед/мл) и соединенного другим концом с датчиком. Дистальную лигатуру завязывали в слабый узел на вене, после чего медленно вводили катетер, направляя загнутой его частью к сердцу. По сигналу на компьютере определяли местоположение катетера, при необходимости изменяя его положение. Появление пульсации катетера и П-образного сигнала

свидетельствовало о нахождении кончика катетера в правом желудочке сердца. После подтверждения нахождения катетера, каудальную лигатуру затягивали. На места имплантации катетеров накладывали вату, смоченную физиологическим раствором для предотвращения подсыхания краев раны.

В течение 30 минут после операции происходила стабилизация гемодинамических параметров, после которой снимали фоновые уровни СПЖД, ЧСС, Ср. АД на протяжении 10 минут. Затем животных декапитировали и вскрывали им грудную клетку для подтверждения нахождения яремного катетера в правом желудочке сердца.

### **Манипуляции *in vitro*** **Морфометрическое исследование**

После регистрации гемодинамических показателей, животных декапитировали и вскрывали им грудную клетку для подтверждения нахождения яремного катетера в правом желудочке сердца. После декапитации извлекали сердце и легкие, промывали в физиологическом растворе от крови, отделяли сердце от легких и снова промывали в чистом физрастворе. Сердце взвешивали, удаляли предсердия, аккуратно отделяли правый желудочек, фиксировали его массу на электронных весах. Затем отделяли межсердечную перегородку и левый желудочек сердца. Для оценки степени развития правожелудочковой гипертрофии рассчитывали следующие индексы:

1. индекс гипертрофии правого желудочка относительно массы сердца:

$$\text{Индекс 1} = \frac{\text{ПЖ}}{\text{Масса сердца}};$$

2. индекс гипертрофии правого желудочка относительно массы желудочков:

$$\text{Индекс 2} = \frac{\text{ПЖ}}{\text{Масса ЛЖ} + \text{масса перегородки}};$$

3. индекс гипертрофии правого желудочка относительно массы тела животного:

$$\text{Индекс 3} = \frac{\text{ПЖ} \times 1000}{\text{Масса тела}};$$

где ПЖ – вес правого желудочка сердца, ЛЖ – вес левого желудочка сердца, П – вес межжелудочковой перегородки сердца.

Кроме выделения и оценки гипертрофии ПЖ у животных измеряли массу лёгких.

### **Измерение реактивности изолированных сегментов лёгочных сосудов на вазоактивные факторы**

После измерения гемодинамических параметров *in vivo*, и проведения морфометрии легких, извлекали правое легкое и располагали его в ванночке с физиологическим раствором

Кребса-Хенслийта. (содержание веществ: NaCl - 118 мМ, KCl – 4,7 мМ, CaCl<sub>2</sub> – 3,3 мМ, MgSO<sub>4</sub> – 2,4 мМ, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,18 мМ, глюкоза – 5,5 мМ, NaHCO<sub>3</sub> – 24,9 мМ; рН 7,4 в течение 20 минут аэрированным карбогеном (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>). Легкое растягивали на булавках и выделяли легочную артерию 1го порядка (a. pulmonalis). С помощью глазного пинцета и иголок лёгочную артерия аккуратно отделяли от паренхимы лёгких. Под артерию помещали лигатуру, надрезали стенку сосуда и вводили кончик перфузирующей канюли до артерии третьего порядка. Все остальные ответвления перевязывали. Затем вырезали выделенный участок легочного русла, так, чтобы длина препарата сегмента легочной артерии составляла ~4 мм, оставляя латеральный конец не закрепленным легочной артерии 3-го порядка свободным. Чтобы избежать повреждения легочного сосуда 3-го порядка, его вырезали вместе с кусочком ткани легкого.

Установка для перфузии изолированных сосудов представляет собой ванну с двойными стенками и термостатирующей машиной, в которой располагается выделенный сегмент лёгочной артерии. Кроме того, в состав установки включены следующие компоненты: датчик давления; усилитель потенциалов; аналого-цифровой преобразователь (L-Card, модель E 14-140); компьютер; перистальтические насосы, обеспечивающие систему внутренней и внешней перфузии изолированного сегмента сосуда. Перфузирование осуществлялось с постоянным расходом в 2 мл/мин для внутреннего протока и 4 мл/мин для внешнего протока. Изолированные сосуды перфузировали модифицированным физиологическим раствором Кребса-Хенслийта (содержание веществ в мМ: NaCl – 118, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 3,3, MgSO<sub>4</sub> – 2,4, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1,18, глюкоза – 5,05, NaHCO<sub>3</sub> – 24,9; рН 7,4). Данный раствор в течение 15 минут предварительно аэрировали карбогеном (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>); температуру раствора поддерживалась на уровне 37–37,5°С. О реакции сосудов судили по изменению перфузионного давления, которое регистрировалось в программе PowerGraph 3.0 (Россия).

Для анализа реактивности сосудов изолированные сегменты лёгочной артерии перфузировались с использованием растворов серотонина ( $1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-8}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М,  $3 \times 10^{-7}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М,  $3 \times 10^{-6}$  М) в качестве вазоконстриктора, ацетилхолина ( $1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-8}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М,  $1 \times 10^{-5}$  М) в качестве вазодилатора (для оценки способности эндотелий-зависимой релаксации) и нитропрусида натрия ( $1 \times 10^{-9}$  М,  $1 \times 10^{-8}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М,  $1 \times 10^{-5}$  М) в качестве вазодилатора (эндотелий-независимая вазодилатация). Раствор меняли на более концентрированный после выхода ответной реакции на плато. Данные экспериментов на изолированных сосудах в таблицах и на рисунках представлены в виде величины перфузионного давления в мм рт. ст. за вычетом фонового значения давления на момент стабилизации изолированного сосуда при перфузии раствором Кребса-Хенслийта.

## Методика определения убихинола в печени крыс методом высокоэффективной газожидкостной хроматографии

Для исследования содержания убихинола у крыс с целью подтверждения высокой биодоступности устанавливали содержание убихинола в печени крыс. Для этого после декапитации в ходе острого эксперимента изымали и промывали печень в физиологическом растворе, затем осушали путем промакивания бумажной салфеткой. Далее отрезали дольку, которую помещали в пробирку, замораживали и также хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Пробоподготовка:* Ткань печени измельчали в гомогенизаторе и смешивали в дистиллированной водой в соотношении 1:4 m/V. Для экстракции аналита из ткани печени к 100 мкл гомогенезата добавляли 220 мкл этанола и 550 мкл n-гексана. Смесь тщательно встряхивали в течение 10 минут. Центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут и собирали верхний слой n-гексана. Затем снова прибавляли 550 мкл n-гексана и повторяли процедуру экстракции и отбора экстракта. Объединенный экстракт упаривали и растворяли в этаноле [4].

*Хроматографический анализ:* Количественное определение проводили методом ВЭЖХ с электро-химическим детектированием на оборудовании фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc», (США): насос модели 580 и электро-химический детектор «Coulchem II», в изократическом режиме на колонке Luna 150×4.6 с сорбентом C18 (5 мкм) при скорости потока элюента 1.3 мл/мин. Подвижная фаза – 0.3% NaCl в смеси этанол-метанол-7% HClO<sub>4</sub> (970:20:10). Электрохимическое детектирование осуществляли в окислительном режиме с помощью аналитической ячейки (model 5011) при напряжении на первой паре электродов - 50мВ и +350мВ – на второй. Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы «Environmental Sciences Associate, Inc», (США). Экстракт анализировали дважды: до и после полного восстановления до убихинола (с помощью добавления раствора натрия тетрагидробората в этаноле). Уровни убихинола, регистрируемые до восстановления, соответствовали концентрации нативного, неокисленного препарата. Добавление восстановителя переводило окисленную форму в восстановленную и позволяло определить общую концентрацию CoQ10 [4].

### Измерение уровня экспрессии микроРНК-21 и -34a

После выделения и оценки степени гипертрофии ткань правого желудочка незамедлительно замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Пробоподготовка:* выделение общей РНК проводили после гомогенизации ткани с использованием набора для выделения «РНК-Экстран» (ЗАО Синтол, Россия) согласно предложенной производителем инструкции.

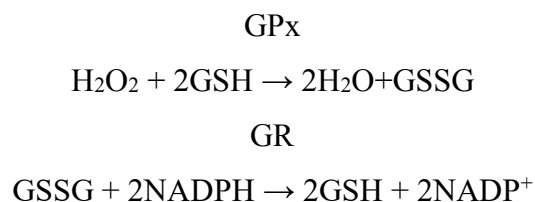
*Проведение ПЦР-РВ анализа:* уровни экспрессии микроРНК определялись в два этапа. В первую очередь, была выполнена обратная транскрипция с использованием специальных наборов праймеров для каждой микроРНК. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора miScript II RT Kit (Qiagen GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Второй этап количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) была выполнена с помощью набора miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Германия). Циклы ПЦР проводились на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). ПЦР проводили при следующих условиях: первичная денатурация – 95°C/ 5 минут; далее 50 циклов, каждый из которых включал денатурацию – 94°C/15 секунд, отжиг – 55 °C/30 секунд и элонгацию 70°C/30 секунд. Все реакции повторяли трижды.

Уровни экспрессии микроРНК были рассчитаны методом  $\Delta\Delta C_t$ . В качестве внутреннего контроля использовалась малые ядерные РНК U6 (U6 small nuclear RNA). В результате обработки измерений были получены значения уровней экспрессии генов в образцах экспериментальных групп относительно микроРНК в контрольной группе.

#### **Определение активности глутатион-пероксидазы в гемолизате крови**

*Пробоподготовка:* собранные образцы венозной крови центрифугировали (3 мин при 4500 об/мин), отбирали плазму, 20 мкл суспензии эритроцитов осторожно собирали со дна пробирки и аликвоту смешивали с 380 мкл деионизированной воды; после интенсивного встряхивания полученный гемолизат замораживали и хранили при -80С.

*Проведение спектрофотометрического анализа:* Активность глутатионпероксидазы (GPx) в гемолизате венозной крови определяли в комплексе с глутатионредуктазой (GR) по скорости окисления NADPH, который используется для восстановления окисленного глутатиона (GSSG). В качестве субстрата глутатионпероксидазы использовалась перекись водорода.



Измерения проводились на спектрофотометре Ultrospec 3300 UV/Visible (Amersham Biosciences). 50 мкл гемолизата добавляли в реакционную среду общим объемом 2,45 мл, содержащую 0,1 М К<sub>2</sub>Na-фосфатный буфер pH 7,0, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ азид натрия, 1 мМ восстановленный глутатион (GSH), 0,2 мМ восстановленный NADPH и 2 U глутатионредуктазы. Кювету помещали в спектрофотометр. Реакцию начинали, добавляя 5 мкл

0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, приготовленной на этаноле, быстро перемешивали и измеряли снижение оптической плотности при  $\lambda=340$  нм в течение 1 мин при 30° С. Активность GPx рассчитывали по следующей формуле

$$A = \frac{\Delta D \times V_{\text{смеси}} \times 10^9 \times K}{\varepsilon \times l \times T \times V_{\text{гемолизата}} \times C_{\text{белка}}} \text{ нмоль/мин/мг белка, где}$$

$\Delta D$  - изменение оптической плотности NADPH в реакционной смеси

$V_{\text{смеси}}$  (л) - объем реакционной смеси (0,0025 л)

$10^9$  - перевод в нмоль NADPH

$K$  – коэффициент разбавления образца венозной крови

$\varepsilon$  – коэффициент экстинкции NADPH (6620  $\times$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>)

$l$  (см) – расстояние оптического пути (1 см)

$T$  (мин) – время инкубации (1 мин)

$V_{\text{гемолизата}}$  (л) – объем добавленного гемолизата (0,00005 л)

$C_{\text{белка}}$  (мг/мл) - концентрация общего белка в образцах гемолизата

Активность GPx выражали в окисленном NADP<sup>+</sup> нмоль/мин/мг белка. Концентрацию общего белка в гемолизатах определяли с помощью набора DC™ Protein Assay Kit II #5000112 (Bio Rad); результаты рассчитывали с помощью микропланшетного ридера Agilent BioTek Synergy H1 Multimode Reader (BioTek); все процедуры проводили в соответствии с протоколом, предложенным производителем указанного набора.

### Статистический анализ

Данные, собранные в ходе эксперимента, оформлены и представлены в виде среднее $\pm$  стандартное отклонение (SD) или среднее $\pm$  ошибка среднего (SEM). Статистический анализ данных проводили в программах Statistica 12.0 (Statistica Inc., США) и GraphPad Prism 8.0. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. One-Way ANOVA использовали для определения наличия статистически значимых различий по одному фактору между средними значениями трех или более независимых групп. Для того, чтобы установить одновременное влияние группы и продолжительности воздействия, а также оценить взаимодействие между этими факторами, использовали двухфакторный дисперсионный анализ Two-way ANOVA. Для сравнения ранговых данных использовали тест Краскела-Уоллиса. Исключение статистических выбросов проводили с использованием критерия ROUT при  $Q$  не  $>1\%$ . Качественные данные описывали абсолютными ( $n$ ) и относительными частотами (%). Как статистически значимый, рассматривали уровень доверительной вероятности не более  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Половые различия контрольных животных

Наблюдение за динамикой изменения массы тела (табл.1) показало ее достоверное увеличение с каждым последующим измерением начиная с 7-го дня как у самцов, так и у самок (табл.1). Однако, интенсивность набора массы достоверно различалась (табл.1). Прирост массы у самцов был в среднем в два раза выше, чем у самок. У здоровых самцов масса последовательно увеличивалась на 10%, 20%, 27,5%, а у самок на 3,5%, 9,8% и 15% на 7, 14 и 21 дни эксперимента соответственно (табл.3).

**Таблица 3.** Динамика набора массы тела самцов и самок в течение 21 дня эксперимента

Группа	n	Дни эксперимента			
		1	7	14	21
		Масса, г			
Самцы	13	207±6	228±8*	250±17 <sup>#</sup>	265±15 <sup>\$</sup>
Самки	13	204±7	211±13 <sup>&amp;,α</sup>	224±14 <sup>@,β</sup>	236±16 <sup>%,γ</sup>

*Самцы* \*день 7 vs день 1, <sup>#</sup>день14 vs день 7, <sup>\$</sup>день 21 vs день 14,  $p<0,01$ ; *самки* <sup>&</sup>день 7 vs день 1, <sup>@</sup>день14 vs день 7, <sup>%</sup>день 21 vs день 14,  $p<0,01$ , <sup>α, β, γ</sup>самцы vs самки,  $p<0,01$ , one-way ANOVA

По результатам еженедельного измерения плетизмографическим методом систолического артериального давления в хвостовой артерии значимых изменений внутри контрольных групп не наблюдалось (табл.4). Кроме того, достоверных различий по данному параметру между самками и самцами также показано не было.

**Таблица 4.** Среднее систолическое давление в хвостовой артерии у самок и самцов на 7,14 и 21 день эксперимента

Дни эксперимента	Группа			
	Самцы	n	Самки	n
	сАД, мм рт.ст.			
0 день	118±13	13	114±13	13
7 день	113±10	13	110±9	13
14 день	115±12	13	110±12	13
21 день	113±10	13	113±12	13

Среднее системное артериальное давление (срАД) и частота сердечных сокращений (ЧСС) измеренные у контрольных самцов и самок прямым методом путем катетеризации бедренной артерии в ходе острого эксперимента под наркозом, не показали статистических отличий между группами и составляли 99±15 и 96±12 мм рт. ст., и 354±37 и 355± 35 уд/мин (рис.5).

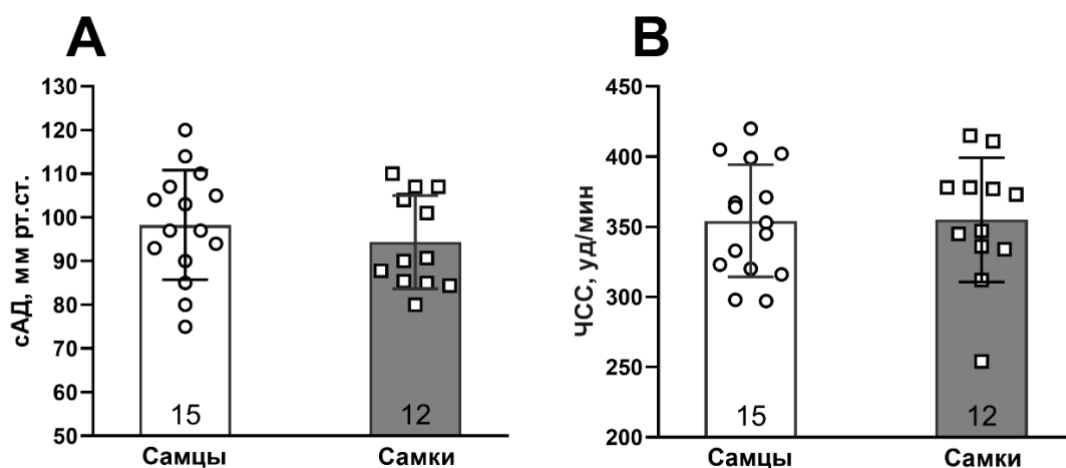


Рисунок 5. А – Среднее системное артериальное давление у контрольных самцов и самок, В – частота сердечных сокращений, измеренные прямым методом

Одним из основных параметров, определяющим наличие легочной гипертензии, является увеличение систолического давления в правом желудочке сердца (СПЖД). В ходе анализа данного показателя в группах контрольных т.е. здоровых животных гендерные различия не были отмечены и составляли  $36,9 \pm 4,9$  мм рт. ст у самцов и  $35,8 \pm 3,5$  мм рт.ст. у самок (рис.6). Полученные результаты соответствуют таковым в экспериментальных работах других авторов [12], где величина СПЖД у здоровых крыс, измеренная под наркозом, варьируется от 30 до 40 мм рт.ст.

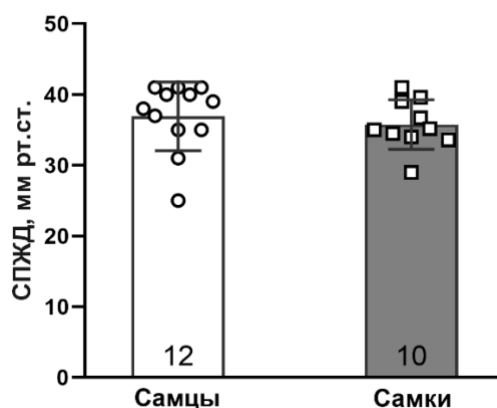


Рисунок 6. Систолическое давление в правом желудочке сердца (СПЖД), измеренное прямым методом у контрольных самцов и самок

Другим важным показателем развития легочной гипертензии является увеличение массы правого желудочка сердца т.е. его гипертрофия. Ввиду того, что масса правого желудочка зависит от массы сердца, а также от массы тела животного, ее не следует анализировать как самостоятельный параметр. Для сравнительного анализа массы правого желудочка сердца были рассчитаны отношения: массы правого желудочка сердца к массе всего сердца – индекс I



(табл.3); массы правого желудочка к сумме масс межжелудочковой перегородки и левого желудочка сердца – *индекс 2* (табл.5); массы правого желудочка к массе тела – *индекс 3* (табл.5).

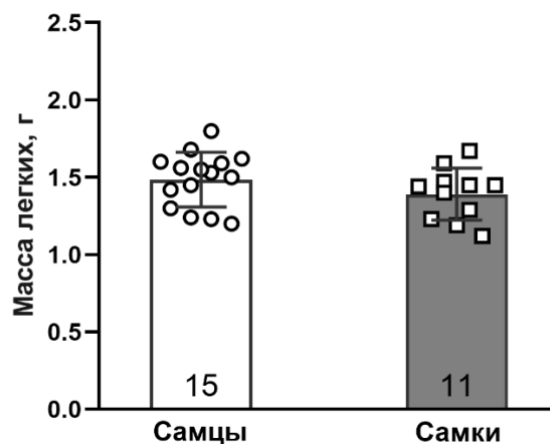
**Таблица 5.** Масса и индексы относительной массы правого желудочка у контрольных самцов и самок на 21 день эксперимента

Наименование индекса	Единицы измерения	Группа			
		Самцы	n	Самки	n
<b>Масса ПЖ</b>	г	0,167±0,026 <sup>#</sup>	15	0,149±0,022	12
<b>Индекс 1</b>	у.е.	0,221±0,023 <sup>*</sup>	15	0,198±0,024	12
<b>Индекс 2</b>	у.е.	0,308±0,030	15	0,301±0,050	11
<b>Индекс 3</b>	у.е.*1000	0,656±0,076	15	0,636±0,083	12

*Самцы vs самки* <sup>#</sup>Масса ПЖ, <sup>\*</sup>Индекс 1,  $p < 0,01$ , Mann-Whitney test

При сравнении относительной массы ПЖ статистически значимое увеличение отмечалось в значениях индекса 1 в группе самцов в сравнении с самками. При расчете других индексов, описывающих размеры ПЖ, достоверной разницы между самцами и самками не обнаружено.

Морфометрический анализ легких показал, что масса легких у здоровых животных не зависит от пола и в среднем составляет 1,53±0,24 г и 1,45±0,27 г у самцов и самок соответственно (рис.7).



*Рисунок 7.* Масса легких контрольных самцов и самок на 21 день эксперимента

Для того, чтобы оценить состояние эндотелия и сосудов было проведено исследование изолированных, перфузируемых сегментов легочных сосудов третьего порядка путем оценки их реактивности в ответ на сосудосуживающие и сосудорасширительные факторы. В качестве констрикторного фактора был выбран серотонин, так как именно он играет ведущую роль в создании сосудистого тонуса кровеносной системы легких. При изучении доза-зависимого ответа легочных сосудов контрольных самцов и самок крыс суживающий ответ на перфузию

растворами серотонина в концентрациях  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  М в группе самцов был  $10,4 \pm 4,2$ ,  $21,9 \pm 3,0$ ,  $26,6 \pm 3,6$  мм рт.ст., что более чем в 5 раз превышает эти показатели у самок  $2,7 \pm 5,4$ ,  $2,9 \pm 4,9$ ,  $5,1 \pm 4,9$  мм рт.ст. ( $p < 0,01$ ) (рис.8.А).

Доза-эффект на эндотелий-зависимый расширительный фактор – ацетилхолин (АЦХ) развивался у животных разных полов по-разному: у самцов эффект расширения развивался доза-зависимо и достигал максимума при концентрации АЦХ  $1 \times 10^{-6}$  М и составлял  $29,4 \pm 3,9\%$ ; у самок максимальное расширение на АЦХ наблюдалось при концентрации  $1 \times 10^{-9}$  М и составляло  $23,0 \pm 12\%$ . Увеличение концентрации АЦХ приводило к уменьшению расширительной реакции, а при концентрациях  $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-7}$  М АЦХ наблюдалось сужение сосудов (рис.8.В). Несмотря на описанные различия в динамике развития расширительной реакции на АЦХ, статистически значимые различия между самцами и самками выявлены не были, что связано с существенными различиями в реакции легочных сосудов самок на АЦХ в отдельных опытах.

Были обнаружены статистически значимые различия в расширительных реакциях легочных сосудов между самцами и самками в ответ на эндотелий-независимый расширительный фактор – нитропруссид натрия (SNP). Как показано на рисунке 8.С расширение в легочных сосудах самок было выражено в значительно большей степени, чем у самцов. Так, в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-6}$  М расширение сегментов легочных сосудов самок достигало 80-100% от исходных значений сосудистого тонуса, создаваемого серотонином. В то время как у самцов при этих же концентрациях SNP расширение составляло 18-36 %.

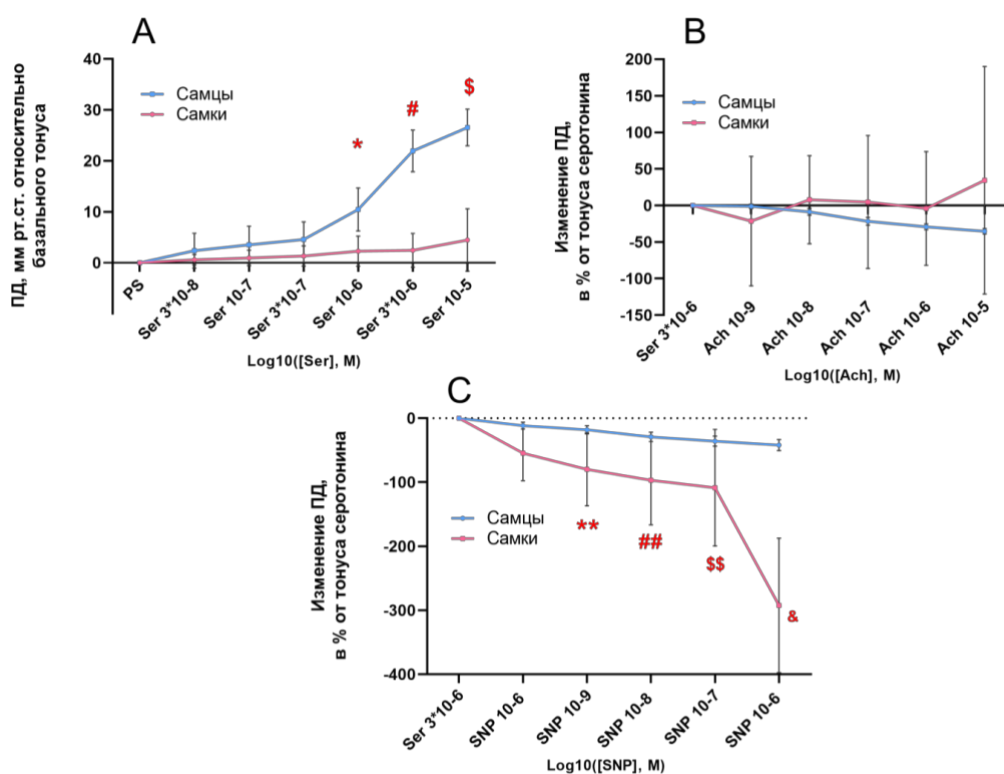


Рисунок 8. А – Доза-ответ изолированных легочных сосудов самок и самцов в ответ на перфузию растворами серотонина ( $3 \times 10^{-8}$  –  $10^{-5} M$ ); В – реакция изолированных легочных сосудов в ответ на перфузию растворами ацетилхолина, С – нитропрусида натрия на фоне тонуса серотонина

А \*,#, \$ самцы vs самки,  $p < 0,01$ , С \*\*,##, \$\$ самки vs самцы,  $p < 0,05$ , & самки vs самцы,  $p < 0,01$ , Two way ANOVA

Гематологический анализ крови показал, что у самцов кислородная функция крови реализуется в основном за счет увеличения в крови количества красных кровяных телец, а у самок преимущественно путем увеличения концентрации гемоглобина в эритроците (таб.6).

Таблица 6. Гематологические параметры крови на 21 день эксперимента

Гематологический параметр	Обозначение	Единицы измерения	Самцы, n=13	Самки, n=9
Лейкоциты	WBC	$10^9/L$	$16,4 \pm 7,57$	$15,5 \pm 6,6$
Эритроциты	RBC	$10^{12}/L$	$8,1 \pm 0,63^*$	$7,0 \pm 1,1$
Гемоглобин	HGB	g/L	$146,5 \pm 9,0$	$142,9 \pm 26,2$
Гематокрит	HCT	%	$47,4 \pm 3,0^@$	$43,5 \pm 6,3$
Средний объем эритроцита	MCV	fL	$59,4 \pm 2,51$	$60,8 \pm 1,8$
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	MCH	Pg	$18,3 \pm 0,8^s$	$21,1 \pm 1,6$
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците	MCHC	g/L	$308,8 \pm 3,75^{\#}$	$321,0 \pm 20,2$
Тромбоциты	PLT	$10^9/L$	$563,2 \pm 25,2$	$631,1 \pm 119,5$

Самцы vs самки: \*RBC, @HCT,  $^s$ MCH,  $p < 0,05$ ;  $^{\#}$ MCHC,  $p < 0,01$ , Mann-Whitney test

По результатам сравнения условно здоровых самок и самцов было установлено, что скорость набора массы самок существенно ниже, а их лёгочные сосуды обладают меньшей сократительной способностью в ответ на перфузию растворами серотонина и большей расширительной способностью при перфузии растворами нитропруссид натрия, в отличие от самцов. Исходно у самцов повышен уровень гематокрита и эритроцитов, а у самок эритроциты в среднем больше по объёму и содержат больше гемоглобина.

### Эффекты солибилизованного убихинола на течение 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс

Для того, чтобы подтвердить увеличение концентрации убихинола, вводимого дважды в дозе 30 мг/кг в хвостовую вену, в первом эксперименте было проведено определение его содержания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Объектом анализа была выбрана ткань печени, отобранная на 22 день эксперимента в остром опыте, так как она является основным депо CoQ10 в организме, что позволяет определить его концентрацию как у животных, которым вводили убихинол, так и нативный уровень у животных, которым его не вводили. В результате было установлено, что содержание убихинола в печени животных, которые были подвергнуты введению убихинола, более чем в 40 раз превышает его среднее содержание в других группах и составляет от 157 до 289 мкг/мл гомогената печеночной ткани ( $p < 0,0001$ ) (рис.9) [111].

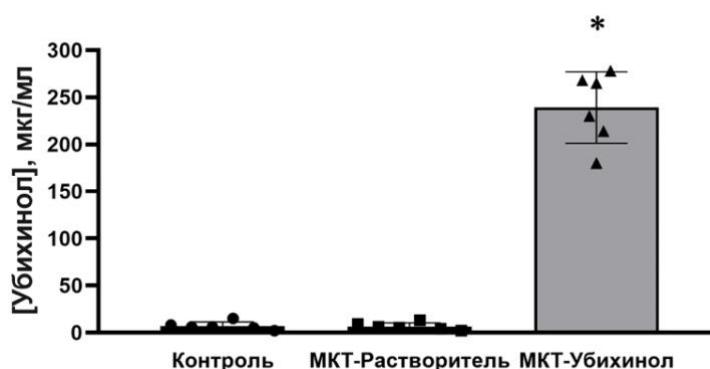


Рисунок 9. Содержание убихинола в печени крыс Wistar на 21 день, измеренное методом ВЭЖХ  
\*МКТ-Убихинол vs Контроль, МКТ-Растворитель,  $p < 0,0001$ , One way ANOVA

Все самцы и самки демонстрировали достоверное увеличение массы при еженедельном последовательном взвешивании (табл.7). Группы самок набирали массу в среднем в два раза менее интенсивно, чем самцы, прибавляя до 16% от первоначальной массы к концу эксперимента (vs 30% у самцов) (табл.7). Также применение МКТ замедляло рост животных обоих полов, так как отмечены существенные отличия между группами контроля и МКТ-группами.

**Таблица 7.** Динамика изменения массы тела у самок и самцов на фоне 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии

Группа	n	Дни эксперимента			
		1	7	14	21
<b>Масса, г</b>					
<b>Самцы</b>					
Контроль	13	207±6	228±8 <sup>*,α</sup>	250±17 <sup>#,α</sup>	265±15 <sup>\$,α</sup>
МКТ-Растворитель	12	208±18	217±22 <sup>**,γ</sup>	230±19 <sup>##,γ</sup>	235±18 <sup>\$\$,γ</sup>
МКТ-Убихинол	13	201±20	218±15 <sup>***,δ</sup>	232±22 <sup>###,δ</sup>	240±25 <sup>sss,δ</sup>
<b>Самки</b>					
Контроль	14	204±6	211±13 <sup>&amp;β</sup>	224±14 <sup>@β</sup>	236±16 <sup>%β</sup>
МКТ-Растворитель	11	202±7	206±11 <sup>&amp;&amp;</sup>	214±10 <sup>@@</sup>	222±16 <sup>%%</sup>
МКТ-Убихинол	11	202±4	209±5 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	214±9 <sup>@@@</sup>	222±9 <sup>%%%</sup>

Самцы: <sup>\*</sup>,<sup>\*\*</sup>,<sup>\*\*\*</sup> день 7 vs день 1, <sup>#</sup>,<sup>##</sup>,<sup>###</sup> день 14 vs день 7, <sup>\$</sup>,<sup>\$\$</sup>,<sup>\$\$\$</sup> день 21 vs день 14,  $p < 0,01$ ,

<sup>α</sup>Контроль 1,7,14 vs МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол,  $p < 0,016$  One way ANOVA

Самки: <sup>&</sup>,<sup>&&</sup>,<sup>&&&</sup> день 7 vs день 1, <sup>@</sup>,<sup>@@</sup>,<sup>@@@</sup> день 14 vs день 7, <sup>%</sup>,<sup>%%</sup>,<sup>%%%</sup> день 21 vs день 14,  $p < 0,01$

<sup>β</sup>Контроль 1,7,14 vs МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол,  $p < 0,05$ , One way ANOVA

Самки vs самцы <sup>γ</sup>МКТ-Растворитель,  $p < 0,01$ , <sup>δ</sup>МКТ-Убихинол,  $p < 0,001$ , Mann-Withney t-test

При анализе данных еженедельного измерения систолического давления в хвостовой артерии между группами контроля и группами, перенесшими инъекцию монокроталина, разницы выявлено не было (табл.8).

**Таблица 8.** Среднее систолическое давление в хвостовой артерии у самок и самцов

Группа	n	Дни эксперимента			
		1 день	7 день	14 день	21 день
<b>Самцы</b>					
Контроль	13	118±13	113±10	115±12	113±10
МКТ-Растворитель	13	123±11	120±11	115±10	115±9
МКТ-Убихинол	12	121±8	118±13	116±15	117±15
<b>Самки</b>					
Контроль	14	114±13	110±9	110±12	110±12
МКТ-Растворитель	11	111±22	112±16	115±13	114±11
МКТ-Убихинол	11	116±16	114±17	114±14	117±11

Сравнительный анализ результатов прямого измерения среднего системного артериального давления (рис.10.А и 10.В) и частоты сердечных сокращений (рис.10.С и 10.Д) показал, что ни инъекция монокроталина, ни двукратное введение убихинола или его растворителя не оказали влияния на эти параметры, то есть внутри групп различий не обнаружено. В группах самцов и самок среднее значение системного артериального давления составляло 95±15 мм рт. ст. и 89±14 мм рт. ст. соответственно, а значение частоты сердечных сокращений составили 372±29 и 358±41 уд/мин, достоверных различий не выявлено. Внутри групп отличий отмечено не было. Данные прямого метода измерения также как и

плетизмографического метода определения систолического давления подтверждают отсутствие системной гипертензии в ходе развития монокроталиновой формы ЛГ.

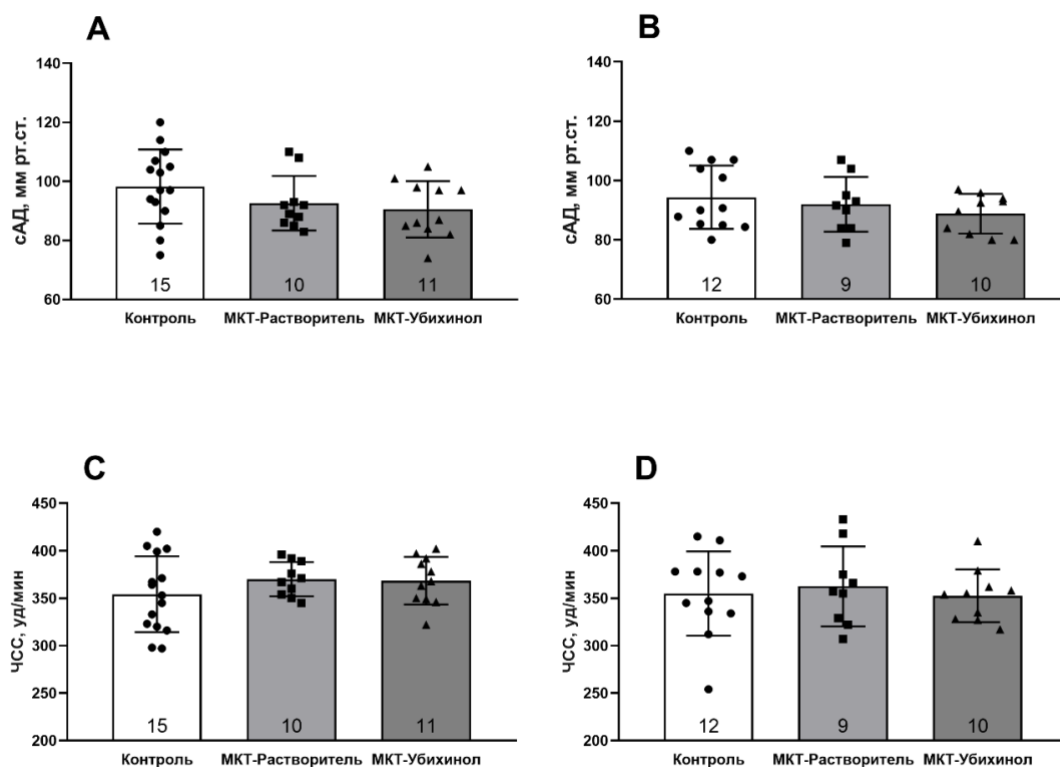


Рисунок 10. Результаты измерения прямым методом под наркозом САД и ЧСС у самцов (А, С) и у самок (В, D) на 21 день после инъекции монокроталина

Регистрация СПЖД показала, что во всех МКТ-группах самцов и самок, его величина была значительно выше (на  $\approx 25\%$  у самцов рис.11А [1] и  $\approx 15\%$  у самок рис.11В) по сравнению с группами контроля и составляла  $45,7 \pm 5,6$  и  $45,0 \pm 5,1$  мм рт.ст. (МКТ-Растворитель самцы и самки),  $44,4 \pm 5,2$  и  $44,3 \pm 5,8$  мм рт.ст. (МКТ-Убихинол самцы и самки) vs  $38,6 \pm 5,6$  и  $35,8 \pm 3,5$  мм рт. ст. (Контроль самцы и самки), что свидетельствует о развитии легочной гипертензии и подтверждает воспроизводимость модели. Двукратное еженедельное внутривенное введение убихинола не привело к достоверному уменьшению СПЖД. Значения СПЖД гипертензивных самцов и самок были сопоставимы [1].

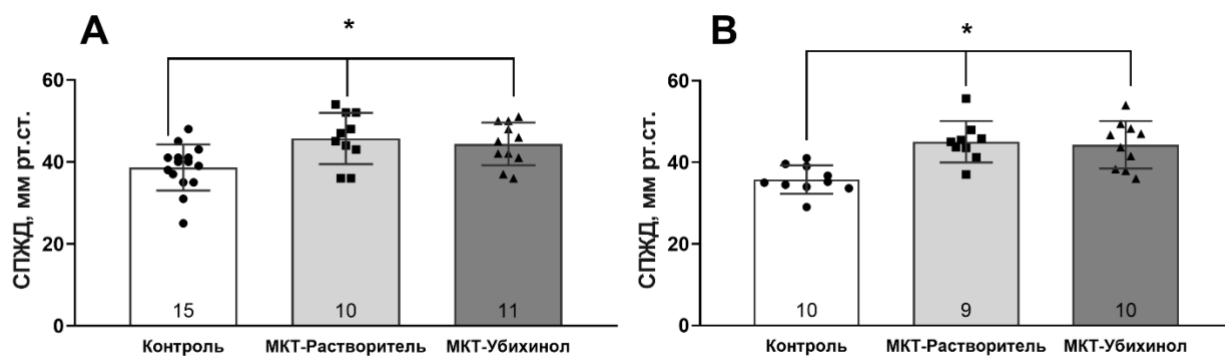


Рисунок 11. Величина систолического давления в правом желудочке сердца, измеренная прямым методом под наркозом у самцов (А) и самок (В) крыс на 21 день после инъекции монокроталина.

Самцы и самки \*Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол,  $p < 0,05$ , One way ANOVA

При оценке гипертрофии правого желудочка сердца было установлено, что масса ПЖ в группе МКТ-Растворитель в сравнении с контрольными животными как у самцов, так и у самок достоверно увеличена по показателям всех индексов гипертрофии (таб.9), что указывает на развитие легочной гипертензии по этому параметру в гипертензивных группах, которым вводился растворитель для убихинола. В группе МКТ-Убихинол различие замечено только при расчете 3 индекса гипертрофии у самок, в остальных случаях независимо от пола ПЖ животных, которым вводили убихинол, нельзя считать гипертрофированным, т.к. достоверных отличий от группы здоровых животных не обнаружено [1].

Таблица 9. Масса и индексы гипертрофии правого желудочка сердца у самок и самцов крыс на 21 день эксперимента

Группа	n	Масса ПЖ, г	Индекс 1, у.е.	Индекс 2, у.е.	Индекс 3, у.е.*1000
<b>Самцы</b>					
Контроль	16	0,167±0,027	0,221±0,021	0,319±0,041	0,646±0,19
МКТ-Растворитель	10	0,208±0,044	0,259±0,060*	0,413±0,161 <sup>#</sup>	0,881±0,184 <sup>\$</sup>
МКТ-Убихинол	9	0,183±0,045	0,233±0,030	0,355±0,08	0,755±0,115
<b>Самки</b>					
Контроль	12	0,150±0,022	0,198±0,024	0,301±0,051	0,636±0,083
МКТ-Растворитель	11	0,186±0,070	0,246±0,042 <sup>\$</sup>	0,420±0,114 <sup>€</sup>	0,828±0,248 <sup>¥</sup>
МКТ-Убихинол	11	0,179±0,040	0,235±0,036	0,376±0,096	0,805±0,187 <sup>£</sup>

Самцы \*<sup>#, \$</sup> МКТ-Растворитель vs Контроль,  $p < 0,05$ , Самки <sup>\$, €, ¥</sup> МКТ-Растворитель vs Контроль,  $p < 0,05$ , <sup>£</sup> МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,05$ , One way ANOVA

Анализ изменения массы легких у самцов и самок с 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензией показал, что независимо от пола значение массы легких достоверно увеличено только в группе МКТ-Растворитель 1,79±0,39 г и 1,79±0,21 г при

сравнении с группами контроля  $1,50 \pm 0,14$  г и  $1,45 \pm 0,27$  г ( $p < 0,05$ ). У самцов и самок, подвергшихся хроническому внутривенному введению убихинола, масса легких составляла  $1,65 \pm 0,24$  г и  $1,57 \pm 0,23$  г соответственно и была статистически неотличима от группы контрольных животных (рис.12).

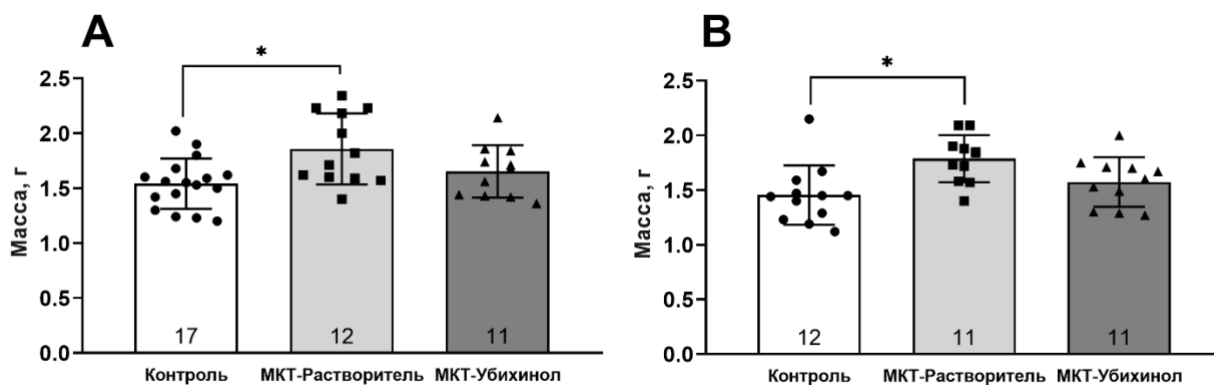


Рисунок 12. Масса легких на 21 день после инъекции монокроталина (А) самцов и (В) самок. Самцы и самки \*Контроль vs MKT-Растворитель,  $p < 0.05$ , One way ANOVA

Таким образом, эффекты применения убихинола на данной модели демонстрируют его протективную роль в отношении ткани правого желудочка сердца и легких. Между самцами и самками на целом животном различий не показано. Эффекта убихинола, реализуемого в отношении снижения СПЖД также не показано. В связи с этим далее для оценки состояния сосудов и эндотелия было проведено исследование реактивности изолированных сегментов легочных сосудов.

В реакции сосудов самцов была выявлено увеличение сократительной реакции на серотонин в группах MKT-Растворитель и MKT-Убихинол по сравнению с условно здоровым контролем, что означает, что исследуемое вещество не оказало влияния на потенцирование сокращения гладких мышц сосудов на серотонин, являющегося фактором патогенеза MKT-ЛГ (рис.13.А) [1]. У самок, напротив применение препарата оказало протективное влияние и реакция сосудов животных, которые получали инъекции убихинола не отличалась от контроля. В группе MKT-Растворитель наблюдалось статистически значимое увеличение суживающей реакции на серотонин в диапазоне концентраций от  $3 \times 10^{-7}$  М до  $3 \times 10^{-6}$  М по сравнению с контрольной группой и группой MKT-Убихинол (рис.13.В).



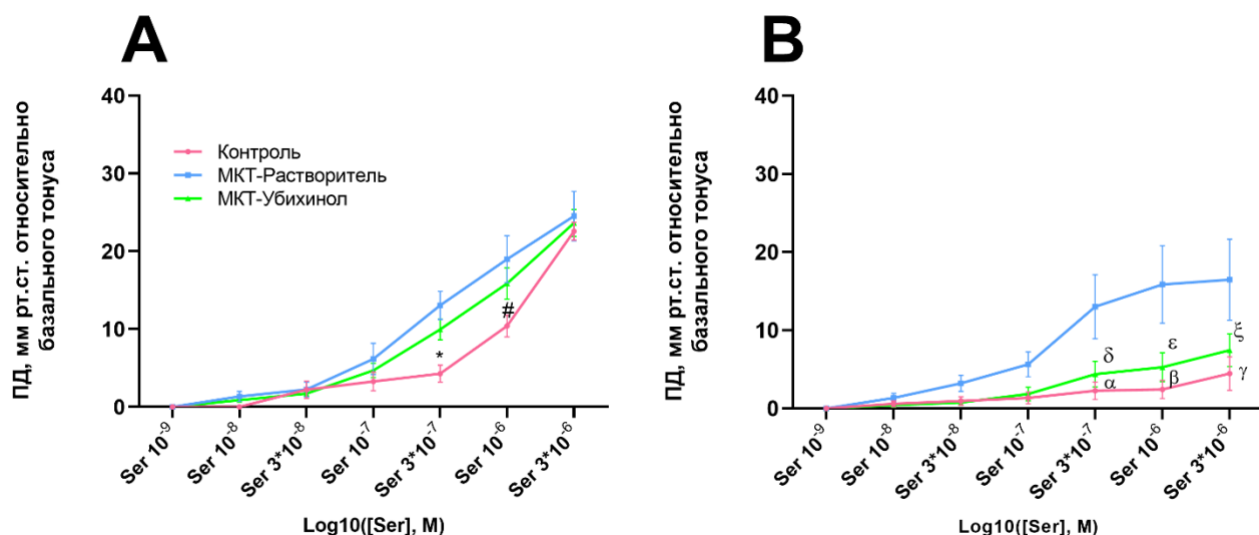


Рисунок 13. Зависимость доза-эффект тонуса легочных сосудов самцов (А) и самок (В) в ответ на перфузию растворами серотонина

Самцы <sup>\*</sup>,<sup>#</sup>Контроль vs MKT-Растворитель,  $p < 0,05$ , MKT-Убихинол,  $p < 0,001$ ; самки <sup>α</sup>Контроль vs MKT-Растворитель,  $p < 0,01$ , <sup>β</sup>  $p < 0,0001$ , <sup>γ</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>ε,γ</sup> MKT-Убихинол vs MKT-Растворитель,  $p < 0,05$ , <sup>ζ</sup>  $p < 0,01$ , Two way ANOVA

Изучение реактивности изолированных сосудов всех экспериментальных групп самцов на эндотелий-зависимый расширительный агент АЦХ выявило уменьшение расширительной реакции в группе MKT-Растворитель как по сравнению с группой контроля, так и группой MKT-Убихинол при концентрации АЦХ  $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$  М. Различий между группами Контроля и MKT-Убихинол выявлено не было (рис. 14.А). У самок во всех экспериментальных группах наблюдались значительные колебания как в величине расширительного ответа на АЦХ, так и его направленности, ввиду чего статистически значимых различий выявлено не было (рис. 14.В) [1].

Таким образом, у самцов развитие MKT-гипертензии в группе гипертензивного контроля (MKT-Растворитель) сопровождается уменьшением АЦХ-вызываемого эндотелий-зависимого расширения, что свидетельствует об ухудшении функции эндотелия. В гипертензивной группе, которой вводился убихинол, величина эндотелий-зависимое расширения увеличивалась и не отличалась от контрольных величин [1].

Так как исследования проводились на препаратах с сохраненным эндотелием, для ответа на вопрос связан ли этот эффект с увеличением секреторной функции эндотелия или с увеличением чувствительности гладкой мышцы к NO, была проведена серия экспериментов с эндотелий-независимым донором NO – нитропруссидом натрия.

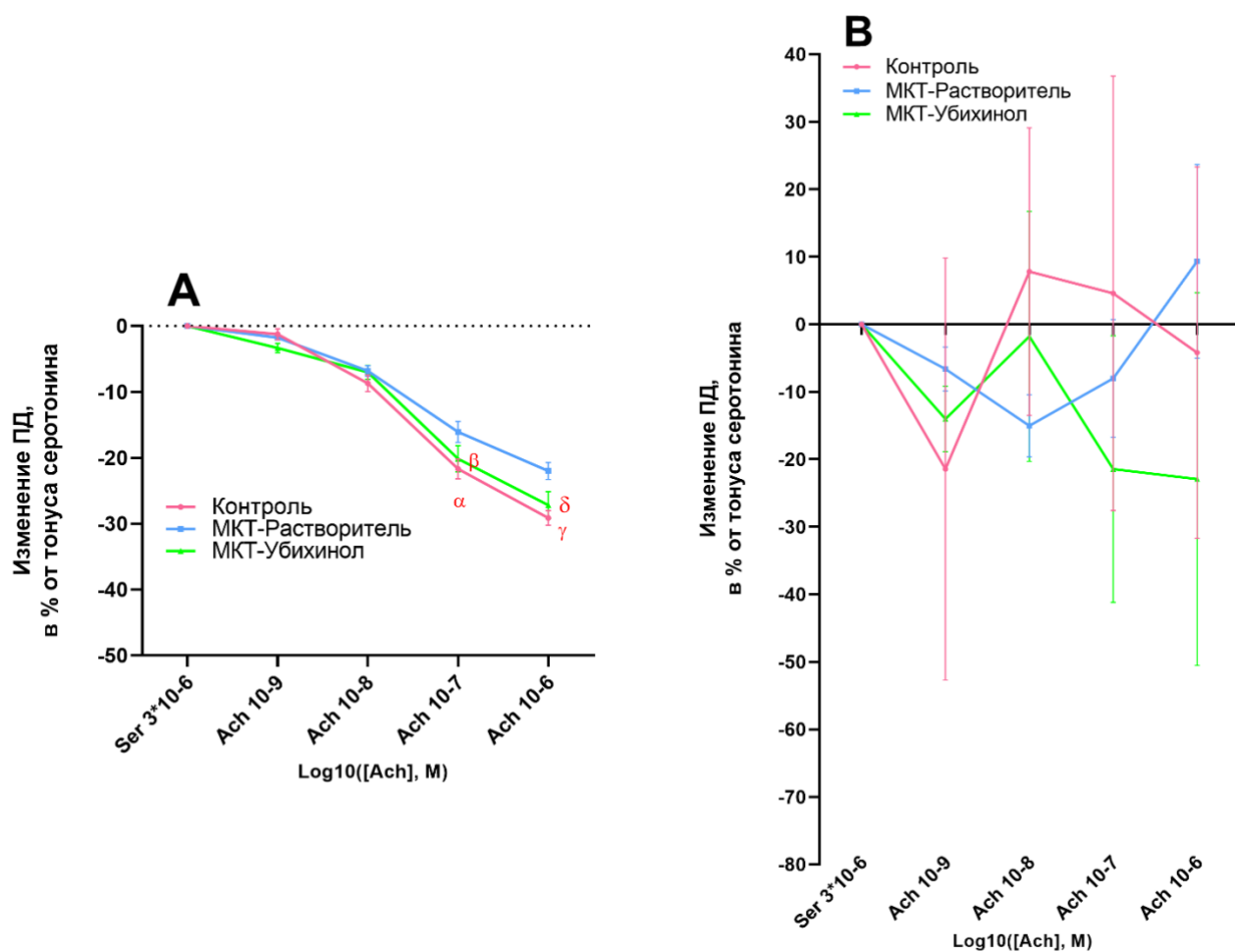


Рисунок 14. Доза-эффект изолированных сегментов легочных сосудов самцов (А) и самок (В) в ответ на перфузию растворами ацетилхолина на фоне тонуса, создаваемого раствором серотонина в концентрации  $3 \times 10^{-6} M$

Самцы  $^{\alpha}$ Контроль vs MKT-Растворитель,  $p < 0,01$ ,  $^{\gamma} p < 0,0001$ ;  $^{\beta}$ МКТ-Убихинол MKT-Растворитель,  $p < 0,05$ ,  $^{\delta} p < 0,01$ , Two way ANOVA

Изучение ответов изолированных сосудов, как самцов, так и самок всех экспериментальных групп в ответ на перфузию растворами эндотелий-независимый расширительного фактора – нитропруссид натрия не выявило достоверных отличий (рис.15). Полученные данные позволяют предположить, что восстановление величины расширительного эффекта на АЦХ в группе МКТ-Убихинол самцов связано с увеличением выделения NO эндотелием легочных сосудов (рис.15.A). Большой разброс данных, наблюдаемый у самок, как при действии АЦХ, так и нитропруссид натрия позволяет говорить о большой индивидуальной изменчивости реактивности легочных сосудов этих животных к вазодилаторным факторам при развитии МКТ-индуцированной легочной гипертензии (рис.15.B).

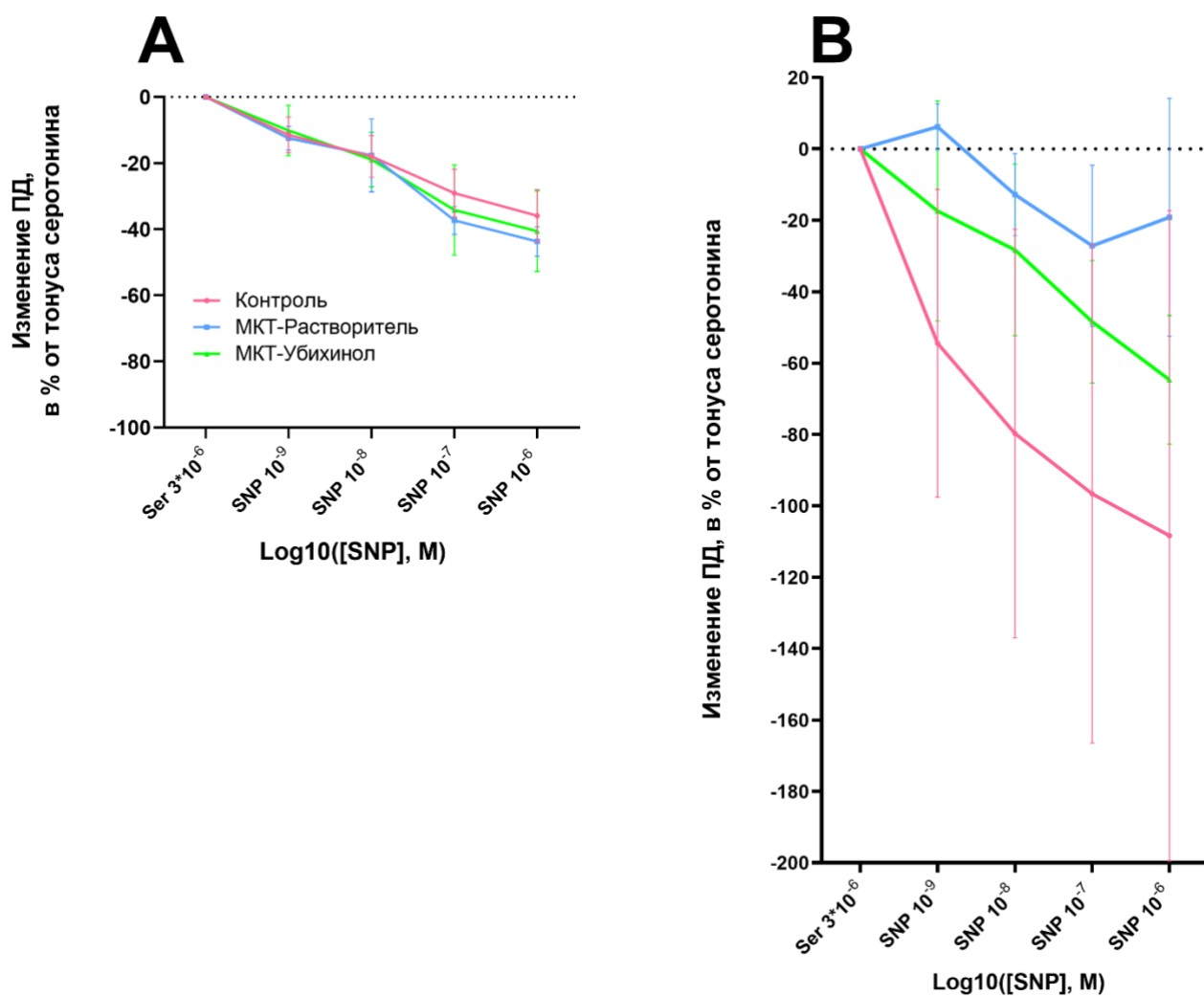


Рисунок 15. Доза-эффект изолированных легочных сосудов самцов (А) и самок (В) в ответ на перфузию растворами нитропрусида натрия на фоне тонуса серотонина

Таким образом, после однократной инъекции монокроталина ЛГ развивается в обеих экспериментальных группах как у самцов, так и у самок крыс. В контрольной группе к введению препарата убихинола – МКТ-Растворитель, которой вводился растворитель препарата, наблюдали статистически значимое увеличение как величины СПЖД, так и степени гипертрофии правого желудочка сердца. В группе МКТ, которой дважды вводился раствор убихинола (МКТ-Убихинол) регистрировали статистически значимое увеличение только значений СПЖД, в то время как относительная масса правого желудочка сердца статистически не отличалась от контрольных величин, как у самцов, так и самок крыс [1]. Кроме того, в этой группе не отмечалось и увеличение массы легких, которое присутствовало в группе МКТ-Растворитель. У самок – наблюдается уменьшение реактивности к сосудосуживающему фактору серотонину. У самцов – увеличивается реактивность к эндотелий-зависимому расширительному фактору – АЦХ, то есть применение убихинола нивелировало деструктивные изменения эндотелия сосудов, вызываемое развитием МКТ-ЛГ [1]. Все вышесказанное

позволяет говорить о протективной роли убихинола в отношении развития МКТ-ЛГ, которая выражается в отсутствии развития гипертрофии ПЖ, увеличения массы легких, возвращению реактивности легочных сосудов к вазоактивным факторам к норме, где были выявлены половые различия.

### **Эффекты солюбилизованного убихинола на течение 4х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов крыс**

Сравнение динамики изменения массы животных показало, что все экспериментальные группы достоверно ее увеличивали, однако в сравнении с контролем средняя масса на 7, 14, 21, 28 дни в группах, получивших инъекцию МКТ была достоверно ниже, чем в группе Контроль. В среднем скорость набора массы животных из группы МКТ-Убихинол и МКТ-Растворитель в сравнении с контролем была на 5% ниже с каждым последующим измерением, начиная с 7 дня. На 28 день различия в массе были максимальными и составляли 13% для для обеих групп относительно контроля (таб.10). Таким образом, однократная инъекция монокроталина приводит к достоверному замедлению прироста массы тела ( $p < 0,01$ ), что подтверждает развитие ЛГ.

**Таблица 10.** Динамика набора массы тела самцов в течение 28 дней эксперимента

День эксперимента	n	Название группы		
		Контроль	МКТ-Растворитель	МКТ-Убихинол
		Масса, г		
1 день	11	215±17	213±15	220±7
7 день	11	235±15	224±16*	230±15 <sup>#</sup>
14 день	11	259±21	239±19 <sup>§</sup>	233±20 <sup>&amp;</sup>
21 день	11	273±19	244±18 <sup>@</sup>	244±27 <sup>%</sup>
28 день	11	281±21	248±20 <sup>?</sup>	246±36 <sup>!</sup>

7 день \*МКТ-Растворитель, <sup>#</sup>МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,05$ , 14 день <sup>§</sup> МКТ-Растворитель, <sup>%</sup>МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,01$ , 21 день <sup>@</sup>МКТ-Растворитель, <sup>%</sup>МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,001$ , <sup>?</sup>МКТ-Растворитель, <sup>!</sup> МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,0001$ , one way ANOVA

Измерение систолического давления у бодрствующих животных показало отсутствие влияния на его величину после введения МКТ в дозе 60 мг/кг и препарата убихинола или его растворителя даже после увеличения длительности наблюдения до 4-х недель, и во всех группах было с средним 116±15 мм рт. ст., что свидетельствует об отсутствии развития системной гипертензии после инъекции монокроталина (таб.11).

Таблица 11. Среднее систолическое давление в хвостовой артерии в течение 28 дней

День эксперимента	n	Название группы		
		Контроль	МКТ-Растворитель	МКТ-Убихинол
		Плетизмографическое АД, мм рт.ст.		
1 день	11	116±13	117±12	114±8
7 день	11	112±11	114±15	119±18
14 день	11	115±12	118±12	114±10
21 день	11	112±10	119±18	119±11
28 день	11	114±8	119±15	117±8

Данные, полученные в остром опыте, путем прямого измерения среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений подтверждают отсутствие влияния монокроталина, препарата убихинола и его растворителя на величину среднего артериального давления в большом круге кровообращения и ЧСС так как достоверных отличий по этим параметрам между группой условно здорового контроля и МКТ-группами на 28 день эксперимента показано не было (рис.16.А, рис. 16.В). Величины сАД и ЧСС составляли 98±3, 102±10, 98±8 мм рт. ст и 354±10, 362±12, 342±17 уд/мин для групп Контроль, МКТ-Растворитель и МКТ-Убихинол соответственно.

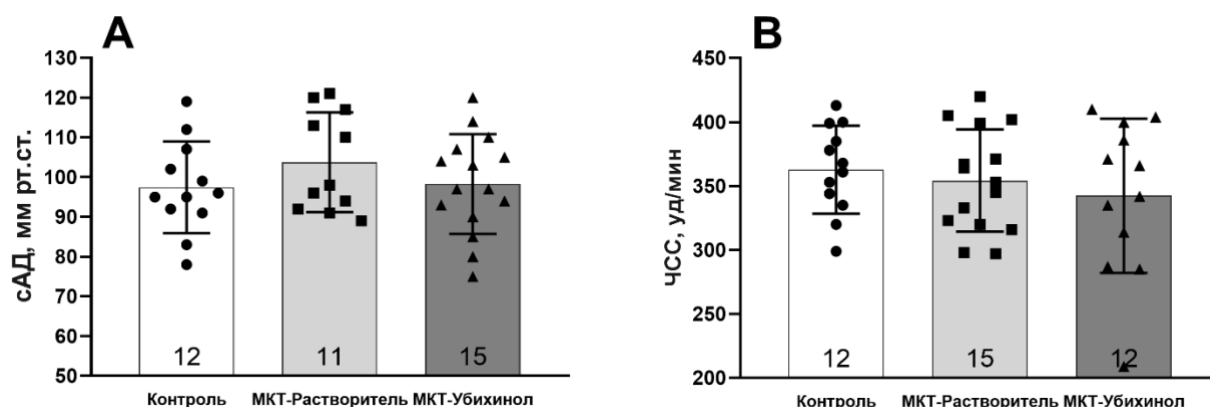


Рисунок 16. Среднее системное артериальное давление (А) и частота сердечных сокращений (В) на 28 день после инъекции МКТ

Значения СПЖД через 4 недели после инъекции монокроталина были достоверно выше в среднем на 50% во всех МКТ-группах в сравнении с контролем, что является одним из признаков развития легочной гипертензии в этих группах. Однако, следует отметить, что значения СПЖД в группах МКТ-Растворитель и МКТ-Убихинол через 28 дней наблюдения были достоверно выше аналогичных значений в эксперименте, выполнявшемся в течение 21 дня и составляли 57,6±9,1 и 58,1±9,8 мм рт.ст. в группах МКТ-Растворитель и МКТ-Убихинол соответственно vs 38,6±5,6 мм рт.ст. в группе Контроль ( $p < 0,01$ ) [112]. Данный факт говорит о более тяжелой степени развития легочной гипертензии (рис.17).

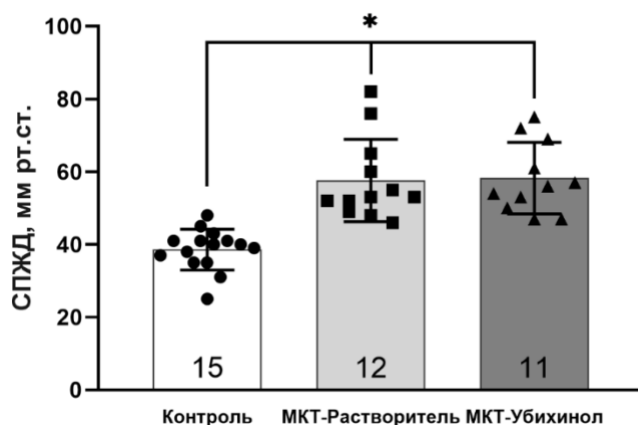


Рисунок 17. Величина систолическое давление в правом желудочке на 28 день после начала эксперимента

\*Контроль vs MKT-Растворитель, MKT-Убихинол,  $p < 0,01$ , One way ANOVA

Исследование индексов массы сердца, как второго симптома развития ЛГ показало, что масса правого желудочка достоверно увеличилась в группах MKT-Растворитель и MKT-Убихинол ( $p < 0,05$ ), что подтверждает наличие патологии. Таким образом, протективный эффект, показанный в предыдущем опыте, при увеличении времени наблюдения нивелировался. Разницы между экспериментальными группами, перенесшими инъекцию монокроталина, ни по одному из индексов показано не было, что отличает влияние убихинола на развитие MKT-ЛГ при ее 4-х недельном развитии (табл.12).

Таблица 12. Масса и индексы гипертрофии правого желудочка сердца у самок и самцов крыс на 21 день эксперимента

Группа	n	Масса ПЖ, г	Индекс 1, у.е.	Индекс 2, у.е.	Индекс 3, у.е.*1000
Контроль	15	0,161±0,029	0,217±0,024	0,304±0,086	0,641±0,08
МКТ-Растворитель	11	0,212±0,039*	0,262±0,025 <sup>#</sup>	0,438±0,055 <sup>\$</sup>	0,892±0,16 <sup>&amp;</sup>
МКТ-Убихинол	13	0,208±0,055 <sup>%</sup>	0,268±0,037 <sup>@</sup>	0,461±0,119 <sup>?</sup>	0,903±0,259 <sup>!</sup>

\*,#,\$,& MKT-Растворитель, %,@,?,! MKT-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,01$ , One way ANOVA

Развитие легочной гипертензии, в особенности, монокроталиновой модели характеризуется развитием воспалительного процесса и фиброзных изменений в структуре легких, что отражается на их массе и размере. При измерении массы легких, разница с группой Контроль была показана только в группе MKT-Растворитель и составила 1,54±0,15 г vs 1,68±0,23 г ( $p < 0,05$ ). Достоверных отличий у животных из контрольной группы с группой MKT-Убихинол (1,68±0,18 г) по-прежнему не наблюдалось. По-видимому, применение убихинола предотвращает структурные изменения в легких животных с MKT-ЛГ даже при более тяжелом развитии патологии (рис.18) [112].

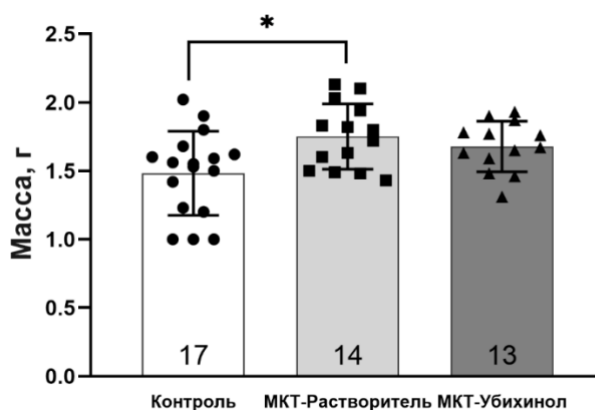


Рисунок 18. Масса легких на 28 день после начала эксперимента

\*Контроль vs МКТ-Растворитель,  $p < 0,05$ , one way ANOVA

При изучении реактивности легочных сосудов было показано, что при перфузии растворами серотонина отмечается значимая сократительная реакция в группе МКТ-Растворитель начиная с  $10^{-7}$ М до  $3 \times 10^{-6}$ М по сравнению с двумя другими группами ( $p < 0,05$ ). На фоне более тяжелой 4х-недельной МКТ-индуцированной ЛГ показано, что убихинол способствует менее выраженному сократительному ответу лёгочных сосудов на перфузию растворами серотонина в диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$ М ( $p < 0,05$ ), чем применение одного растворителя. При этом величины сократительных ответов легочных сегментов сосудов из группы МКТ-Убихинол статистически значимо не отличались от группы негипертензивного контроля. Однако, при достижении концентрации серотонина  $3 \times 10^{-6}$ М это отличие нивелировалось (рис.19.А) [112].

Анализ результатов измерения доза-зависимого расширительного эффекта изолированных перфузируемых легочных сосудов крыс в ответ на ацетилхолин показал, что сосуды животных из групп Контроль и МКТ-Убихинол в концентрациях от  $10^{-7}$  до  $10^{-5}$  М ( $p < 0,05$ ) расширяются значительно сильнее  $-27,2 \pm 7,1\%$  и  $-31,7 \pm 6,3\%$  соответственно, чем в группе МКТ-Растворитель  $-22,0 \pm 4,3\%$  ( $p < 0,05$ ) (рис.19.В) [112].

Изучение расширительной реакции в ответ на эндотелий-независимый донор NO – нитропруссид натрия не выявило различий между группами. Таким образом, ни убихинол, ни растворитель достоверно не влияют на чувствительность гладких мышц легочных сосудов к воздействию донора NO и описанный выше эффект увеличения расширительной реакции на ацетилхолин в группе МКТ убихинол опосредуется, по-видимому, увеличением количества оксида азота, синтезируемого в эндотелии под действием АЦХ (рис.19.С) [112].

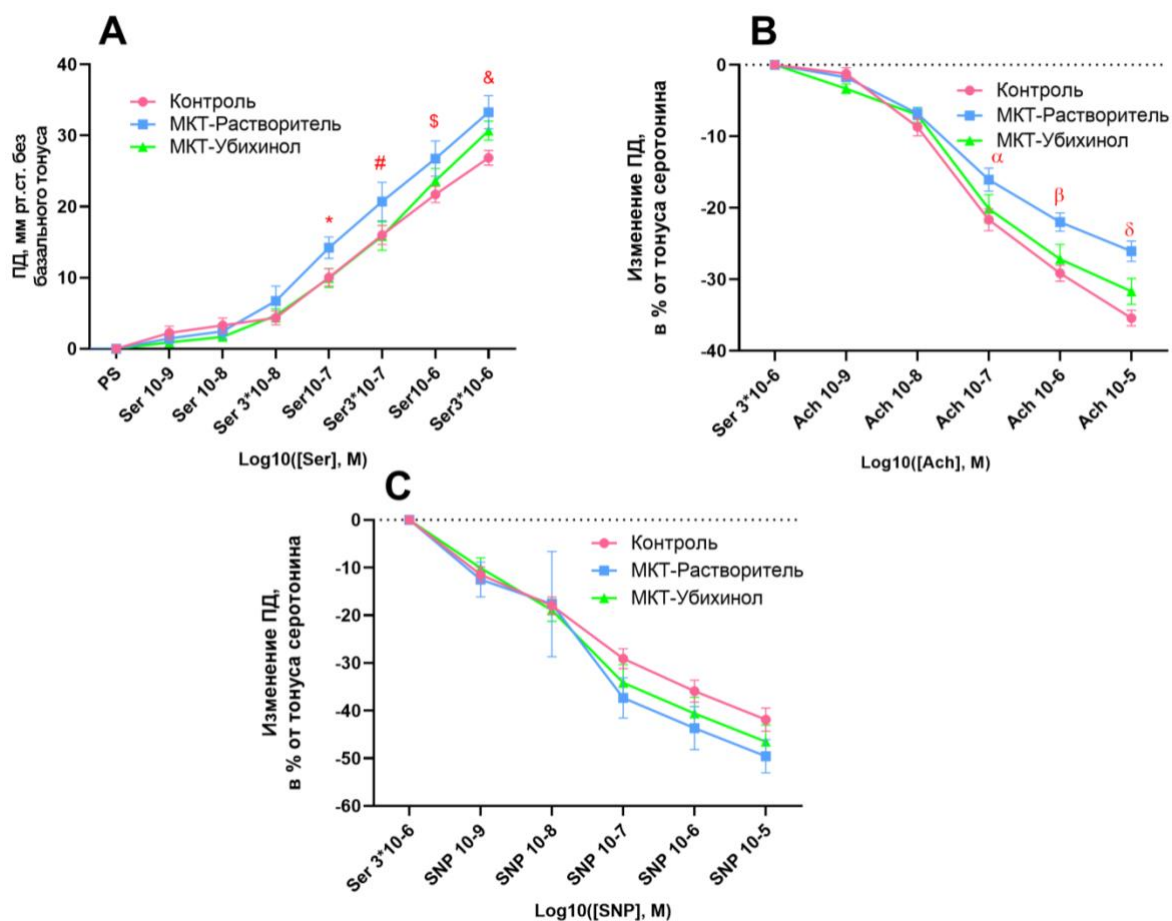


Рисунок 19. Реакция изолированных легочных сосудов на перфузию растворами (А) серотонина, (В) ацетилхолина, (С) нитропрусида натрия в различных концентрациях у самцов на 28 день наблюдения

\*,#,\$ MKT-Растворитель vs Контроль, MKT-Убихинол,  $p < 0,05$ , &, $\alpha$  MKT-Растворитель vs Контроль,  $p < 0,05$ ,  $\beta, \delta$  MKT-Растворитель vs Контроль, MKT-Убихинол,  $p < 0,05$ , One way ANOVA

Известно, что синтез оксида азота в эндотелии сосудов в значительной степени зависит от уровня окислительного стресса в ткани и, связанной с ним воспалительной реакции. Для оценки уровня воспаления в группах с MKT-ЛГ было проведено исследование уровней экспрессии маркёров развития воспаления (микроРНК-34а) и гипертрофии (микроРНК-21) в образцах ткани правого желудочка сердца крыс. Были выявлены достоверные отличия в экспериментальных группах MKT-Растворитель и MKT-Убихинол в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). Так, экспрессия микроРНК-21 в MKT-Убихинол возросла в 3,92 раза, а MKT-Растворителя - в 4,26 раза, однако, между собой экспериментальные группы достоверно не отличались (рис.20А) [112].

Экспрессия микроРНК-34а была достоверно выше во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем. Однако, сравнение между экспериментальными группами выявило, что экспрессия микроРНК-34а была достоверно ниже в тканях правого желудочка животных,



которым вводился убихинол по сравнению с группой легочно-гипертензивного контроля (МКТ-Растворитель). Увеличение микроРНК-34а составило 2,24 раза в МКТ-Убихинол, в то время как для группы МКТ-Растворитель оно составляло 2,80 ( $p < 0,05$ ) (рис.20.В) [112].

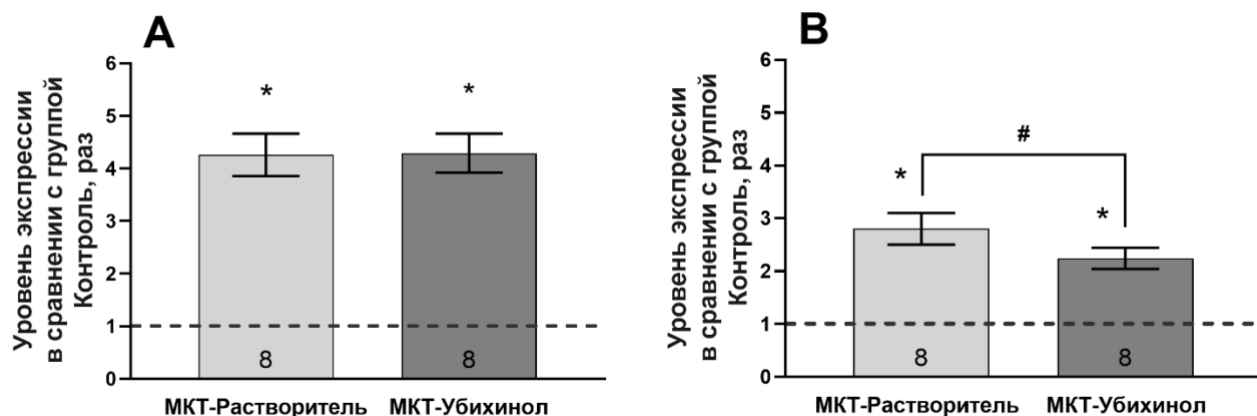


Рисунок 20. Уровень экспрессии микроРНК-21 (А) и микроРНК-34а (В) в группах МКТ-Растворитель и МКТ-Убихинол относительно контрольной группы (уровень указан пунктирной линией).

\*МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол vs Контроль,  $p < 0,01$ , #МКТ-Растворитель vs МКТ-Убихинол,  $p < 0,05$ , One way ANOVA.

Таким образом, анализ результатов уровня экспрессии маркёров микроРНК выявил достоверно значимое влияние убихинола на маркер развития воспаления в ткани правого желудочка на фоне развития лёгочной гипертензии, но в то же время показано, что внутривенно вводимый убихинол не влиял на маркер гипертрофии.

Исходя из полученных данных, можно сказать, что увеличение длительности развития МКТ-ЛГ с 3-х до 4-х недель приводит к повышению СПЖД в среднем на 10 мм рт.ст. Наблюдаемый на 3х-недельной модели протективный эффект убихинола в отношении гипертрофии ПЖ при более тяжелом течении легочной гипертензии не выявляется. Несмотря на отсутствие влияния на главные признаки заболевания (СПЖД и гипертрофии ПЖ), убихинол предположительно замедляет фиброзные изменения легких. Убихинол уменьшает чувствительность легочных сосудов к серотонину, и увеличивает эндотелий-зависимый расширительный ответ на перфузию растворами ацетилхолина. В эксперименте были показаны противовоспалительные свойства убихинола, о чем свидетельствует снижение экспрессии одного из провоспалительных маркёров микроРНК-34а [112].

Несмотря на то, что на 4х-недельной модели МКТ-ЛГ сохранялись протективные эффекты, выражающиеся в препятствии увеличения массы легких, сохранении функции эндотелия, а также было подтверждено противовоспалительное действие при применении

убихинола, но эти эффекты не влияли на основные маркеры МКТ-ЛГ. В связи с этим последующее исследование было решено проводить на менее тяжелой 3х-недельной модели, в которой эффекты применения убихинола проявлялись ярче. В дальнейшем эксперименте, согласно задачам данной работы, также был добавлен порошок селена в дозе 10 мкг/кг с целью потенцирования основных эффектов, оказываемых убихинолом на основные маркеры.

### **Влияние комбинации солюбилизованного убихинола и селена на течение 3х-недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс**

Известно, что существует положительная корреляция между потреблением селена и количеством селен-содержащих ферментов, поэтому для того, чтобы установить привело ли пероральное ежедневное введение порошка селена к увеличению его концентрации в организме животных была проведена спектрофотометрическая оценка уровня активности селен-зависимого фермента – глутатион-пероксидазы. При сравнении активности глутатион-пероксидазы в гемолизате крови (табл.13), собранном в конечной точке эксперимента было показано, что у самцов активность глутатион-пероксидазы была максимальной в группе МКТ-Растворитель, и превышала таковые значения в группах контроля ( $p < 0,05$ ), МКТ-Убихинол и МКТ-Se ( $p < 0,01$ ). Между группами самок такой разницы показано не было. Однако, все группы самок, кроме МКТ-Растворитель, по данному параметру превосходили самцов в среднем на 15-50% ( $p < 0,01$ ) [111], что соответствует литературным данным [97] (табл.13).

Отсутствие выраженного увеличения активности глутатион-пероксидазы в группах самок, принимающих пероральный порошок селена, может быть обусловлено влиянием эстрогена на включение селена в состав ферментов.

**Таблица 13.** Активность глутатион-пероксидазы в гемолизате крови на 21 день эксперимента

Группа	Контроль	МКТ-Растворитель	МКТ-Убихинол	МКТ-Se	МКТ-Se-Убихинол
<i>мкмоль НАДФН/мин*Vобразца</i>					
<b>Самцы</b>	7,021±0,826	8,079±0,266* <sup>#</sup>	6,611±0,593	6,348±0,569	7,172±0,364
<b>Самки</b>	10,880±1,792 <sup>§</sup>	9,365±1,346	9,420±0,441 <sup>§</sup>	9,764±1,418 <sup>§</sup>	9,637±0,411 <sup>§</sup>

\*МКТ-Растворитель vs Контроль,  $p < 0,05$ ; #МКТ-Растворитель vs МКТ-Убихинол, МКТ-Se,  $p < 0,01$ , one way ANOVA

<sup>§</sup>Самки vs Самцы,  $p < 0,01$ , one way ANOVA

Наблюдение за динамикой изменения массы тела у самок и самцов показало, что животные росли неравномерно. Аналогично предыдущим экспериментам, самцы увеличивали массу с средним в два раза быстрее, чем самки, что связано с анаболическими эффектами

тестостерона у самцов, однако в группе МКТ-Se самцов в последнюю неделю эксперимента набор массы остановился, достигнув  $227 \pm 27$  г (табл.14).

**Таблица 14.** Динамика набора массы тела самцов и самок в течение 21 дня эксперимента

Группа	n	Дни эксперимента			
		1	7	14	21
		Масса, г			
<b>Самцы</b>					
Контроль	8	203±7*	238±8 <sup>μ,λ</sup>	257±18 <sup>Ω,α</sup>	279±16 <sup>ω,§</sup>
МКТ-Растворитель	9	197±12*	218±11 <sup>£</sup>	228±24	232±38
МКТ-Убихинол	9	200±9*	224±11 <sup>¥</sup>	237±13 <sup>€</sup>	241±27 <sup>Р</sup>
МКТ-Se	10	202±7*	219±6 <sup>Г</sup>	227±15 <sup>У</sup>	227±27
МКТ-Se-Убихинол	8	198±9*	222±7 <sup>#</sup>	232±9 <sup>@</sup>	241±16 <sup>%</sup>
<b>Самки</b>					
Контроль	14	204±8*	211±13	224±14 <sup>Х</sup>	236±16 <sup>&amp;</sup>
МКТ-Растворитель	11	202±7*	206±11	214±10	222±16
МКТ-Убихинол	11	202±4*	210±5	214±9	222±9
МКТ-Se	12	201±5*	209±8	214±10	224±14
МКТ-Se-Убихинол	11	202±5*	210±8	213±10	225±11

Для каждой группы самцов и самок \*масса в 1 день vs 7,14,21 день,  $p < 0,05$ , самцы <sup>μ,Ω</sup>Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Se,  $p < 0,01$ , <sup>ω</sup>Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол, МКТ-Se, МКТ-Se-Убихинол,  $p < 0,01$ ;

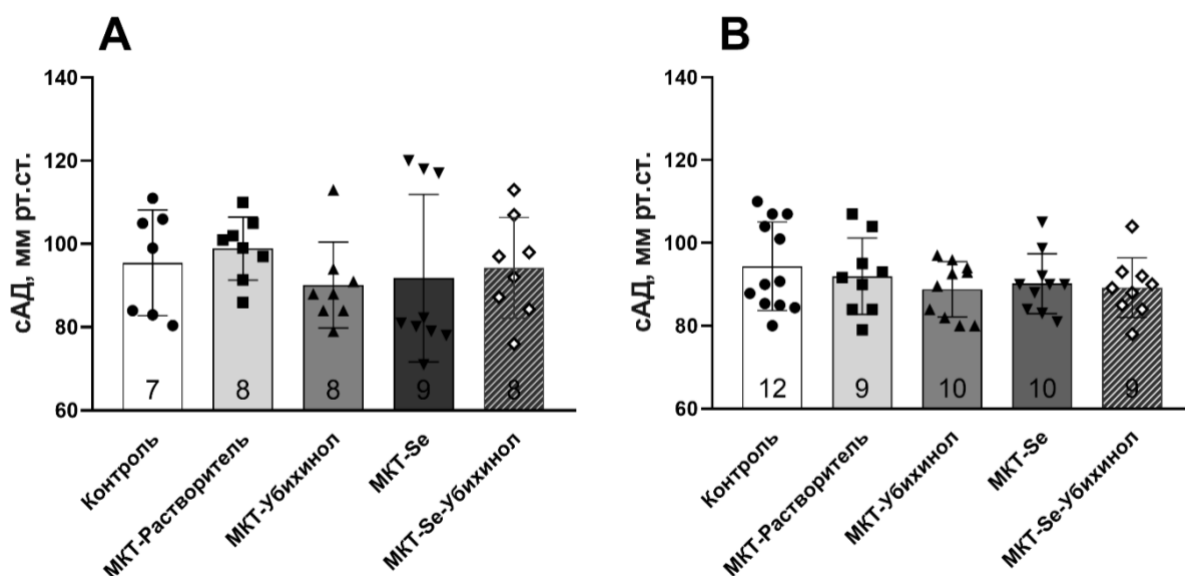
самки <sup>Х,&</sup>Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол, МКТ-Se,  $p < 0,05$ , two way ANOVA, <sup>λ,α,§</sup>Контроль самцы vs самки,  $p < 0,01$ , <sup>£</sup>МКТ-Растворитель самки vs самцы,  $p < 0,05$  <sup>¥,€,Р</sup>МКТ-Убихинол самцы vs самки,  $p < 0,05$ , <sup>Г,У</sup>МКТ-Se самцы vs самки,  $p < 0,05$ , <sup>#,@,%</sup> МКТ-Se-Убихинол самцы vs самки,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test

Ни в одной из групп самцов и самок не наблюдали увеличения среднего систолического артериального давления. Между самцами и самками так же разницы обнаружено не было. У самцов значения среднего систолического давления составляли для всех групп самцов в течение наблюдения  $116 \pm 118$  мм рт. ст., а для самок  $113 \pm 10$  мм рт. ст., что в очередной раз подтверждает отсутствие системной гипертензии при применении МКТ в дозе 60 мг/кг (таб. 15) [111].

**Таблица 15.** Изменение систолического давления в хвостовой артерии у самцов (А) и самок (В) в течение 21 дня эксперимент

Группа	n	Дни эксперимента			
		1 день	7 день	14 день	21 день
<b>Самцы</b>					
Контроль	8	116±11	110±10	109±10	114±13
МКТ-Растворитель	9	119±10	122±11	113±10	117±14
МКТ-Убихинол	9	117±13	118±15	111±16	117±14
МКТ-Se	10	115±13	119±9	120±13	121±18
МКТ-Se-Убихинол	8	115±17	108±17	122±14	118±10
<b>Самки</b>					
Контроль	14	115±10	109±20	110±21	115±17
МКТ-Растворитель	11	111±21	113±15	111±10	112±10
МКТ-Убихинол	11	115±12	114±13	115±16	118±9
МКТ-Se	12	109±10	107±20	114±15	117±14
МКТ-Se-Убихинол	11	115±15	116±19	116±14	111±10

В остром опыте показано, что среднее артериальное давление (рис.22) варьировалось незначительно и составляло  $95\pm 12$ ,  $98\pm 8$ ,  $90\pm 10$ ,  $92\pm 20$ ,  $94\pm 12$  мм рт. ст. и  $94\pm 10$ ,  $91\pm 9$ ,  $89\pm 7$ ,  $90\pm 7$ ,  $89\pm 7$  в группах Контроль, МКТ-Растворитель, МКТ-Убихинол, МКТ-Se и МКТ-Se-Убихинол самцов и самок соответственно (рис.21). Частота сердечных сокращений также не различалась как внутри групп, так и между группами и в среднем у самцов была на уровне  $356\pm 29$  уд/мин, а у самок  $358\pm 33$  уд/мин (рис.22), что говорит об отсутствии влияния инъекции МКТ в дозе 60 мг/кг и применении растворителя, убихинола и селена на основные показатели большого круга кровообращения [111].



*Рисунок 21. Среднее системное артериальное давление у самок (А) и самцов (В) на 21 день эксперимента*

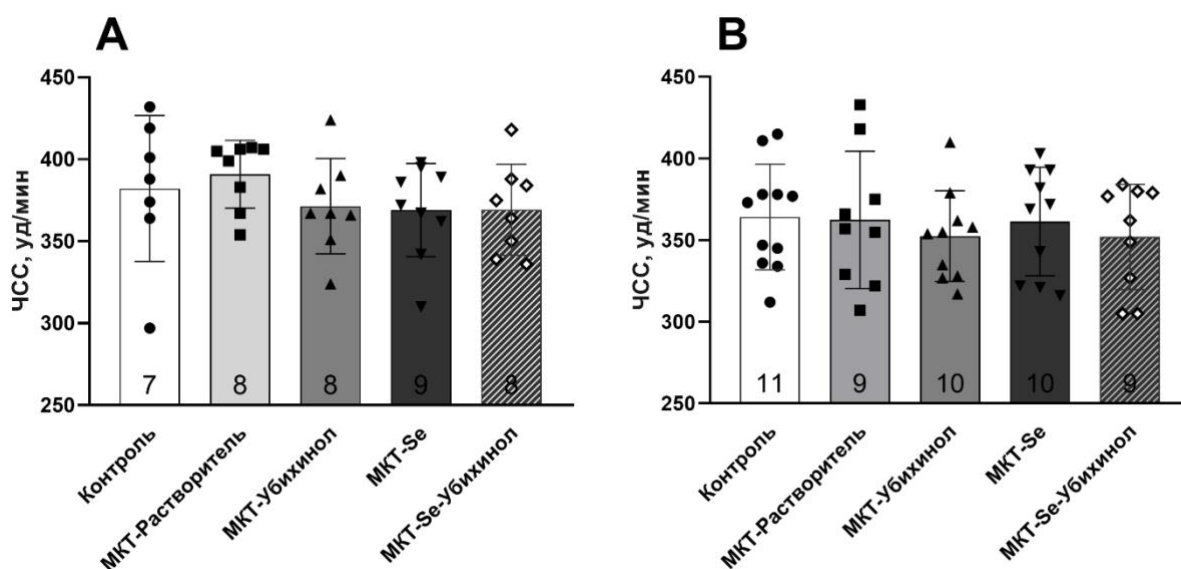


Рисунок 22. Частота сердечных сокращений у самцов (А) и самок (В) крыс на 21 день эксперимента

Как уже неоднократно упоминалось, увеличение систолического давления в правом желудочке сердца один из ведущих признаков наличия легочной гипертензии. Было показано, что величина СПЖД у самцов из группы МКТ-Se-Убихинол ( $42,6 \pm 3,0$  мм рт.ст.) достоверно не отличались от группы контроля ( $38,4 \pm 7,7$  мм рт.ст.), т.е. по этому показателю у животных, получавших инъекцию убихинола и селен ежедневно. В остальных группах наблюдалось статистически значимое повышение СПЖД, что подтверждает наличие заболевания на 37% (рис.23). Важно отметить, что у самок присутствовали животные, величина СПЖД, которых, не превышала нормальных значений ( $\approx 40$  мм рт. Ст.), чего почти не наблюдалось у самцов [111].

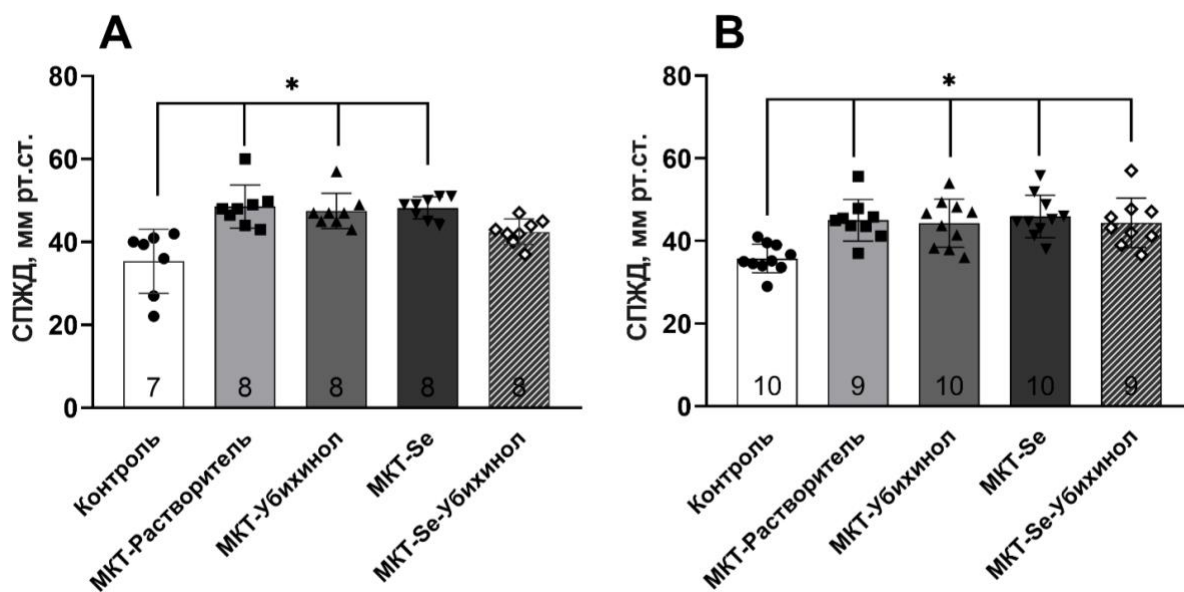


Рисунок 23. Систолическое давление в правом желудочке сердца у самцов (А) и самок (В) крыс на 21 день эксперимента

Самцы \*Контроль vs МКТ-группы,  $p < 0,05$ , One way ANOVA

Сравнительный анализ другого важного симптома развития легочной гипертензии - гипертрофии ПЖ показал, что у контрольных самцов и самок средние значения всех индексов в группе значимо ниже, чем в группах МКТ-Растворитель и МКТ-Se ( $p < 0,05$ ). Различий между группами самцов и самок МКТ-Убихинол и МКТ-Se-Убихинол с группами соответствующего контроля ни по одному из индексов у животных обоих полов не выявлено (табл.16). Эти данные подтверждают результаты предыдущих экспериментов и свидетельствуют о защитном действии убихинола и его комбинации с селеном на массу правого желудочка сердца при легочной гипертензии. Различий между самцами и самками не обнаружено (табл.16) [111].

**Таблица 16.** Масса и индексы гипертрофии правого желудочка сердца у самок и самцов крыс на 21 день эксперимента

Группа	n	Масса ПЖ, г	Индекс 1, у.е.	Индекс 2, у.е.	Индекс 3, у.е.*1000
<b>Самцы</b>					
<b>Контроль</b>	8	0,167±0,017	0,202±0,016*	0,300±0,027#	0,611±0,057 <sup>U</sup>
<b>МКТ-Растворитель</b>	9	0,186±0,037	0,248±0,041	0,413±0,109	0,877±0,328
<b>МКТ-Убихинол</b>	8	0,182±0,022	0,237±0,038	0,376±0,053	0,740±0,115
<b>МКТ-Se</b>	9	0,174±0,023	0,248±0,026	0,401±0,783	0,796±0,171
<b>МКТ-Se-Убихинол</b>	8	0,185±0,026	0,242±0,029	0,379±0,058	0,751±0,094
<b>Самки</b>					
<b>Контроль</b>	12	0,150±0,022	0,198±0,024 <sup>§</sup>	0,301±0,050 <sup>€</sup>	0,636±0,083 <sup>¥</sup>
<b>МКТ-Растворитель</b>	11	0,186±0,070	0,246±0,042	0,420±0,114	0,828±0,248
<b>МКТ-Убихинол</b>	11	0,168±0,023	0,225±0,020	0,350±0,043	0,754±0,083
<b>МКТ-Se</b>	11	0,175±0,035	0,243±0,036	0,403±0,086	0,792±0,148
<b>МКТ-Se-Убихинол</b>	10	0,164±0,020	0,225±0,045	0,360±0,084	0,733±0,113

Самцы <sup>\*,#,<sup>U</sup></sup>Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Se,  $p < 0,05$ , самки <sup>§,€,<sup>¥</sup></sup>Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Se,  $p < 0,05$ , one way ANOVA

Масса легких у самцов при сравнении с группой Контроль (1,39±0,22 г) существенно не отличалась от групп МКТ-Убихинол (1,78±0,39 г) и МКТ-Se-Убихинол (1,53±0,30 г), а масса легких животных из остальных МКТ-Групп была, напротив, значимо выше (1,79±0,3 г) МКТ-Растворитель и МКТ-Se (2,03±0,4 г) ( $p < 0,05$ ). Также отмечено отличие между группами самцов МКТ-Se и МКТ-Se-Убихинол ( $p < 0,05$ ). У самок по массе легких только группа МКТ-Убихинол не отличалась от группы Контроль. Между самцами и самками различия не обнаружено (рис.24)

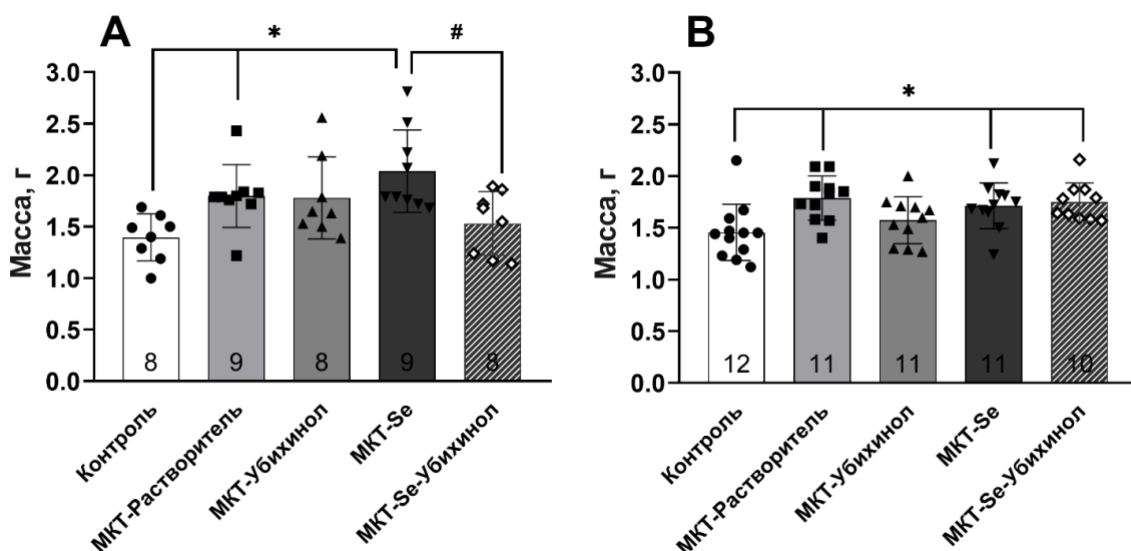
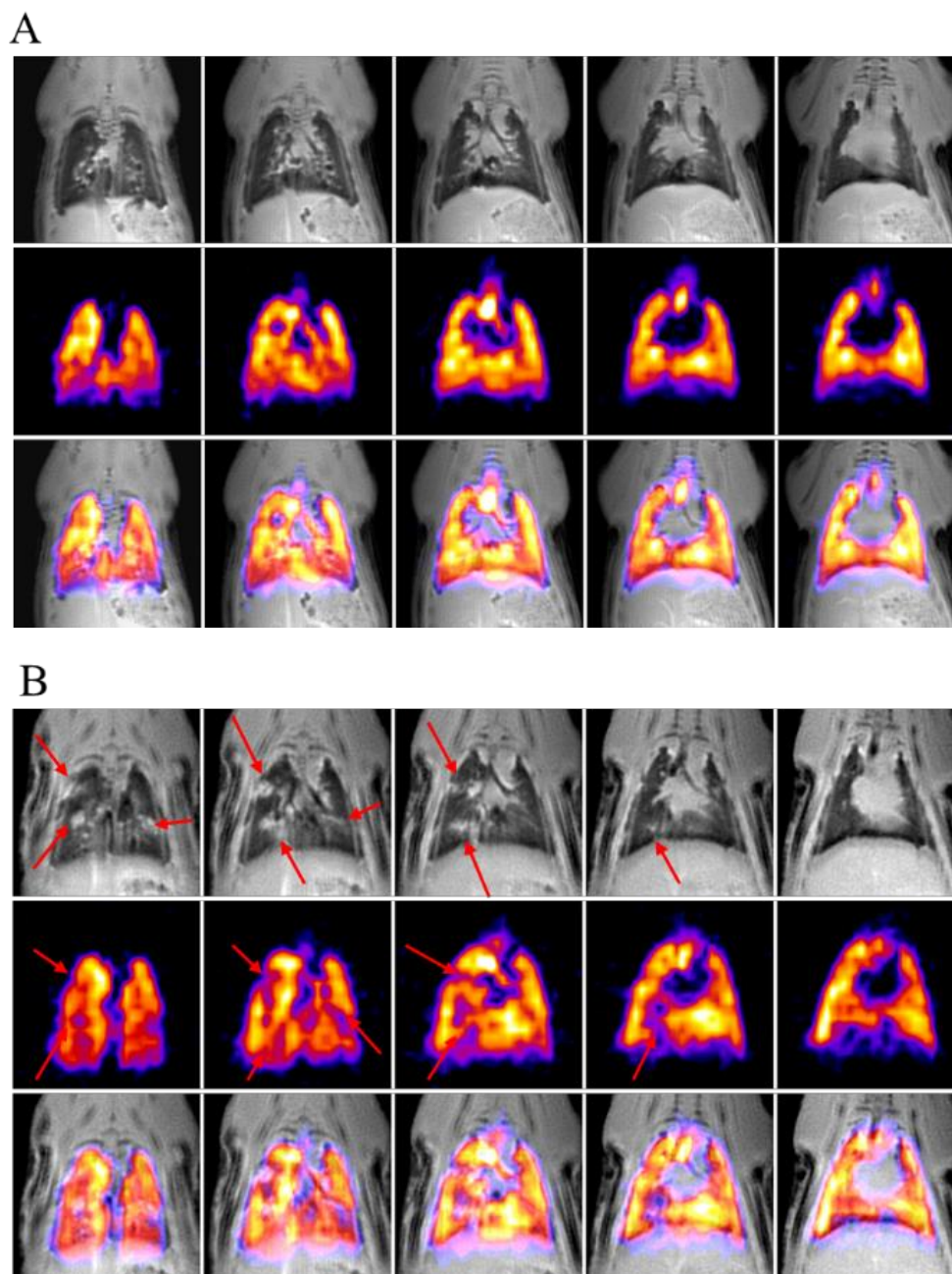


Рисунок 24. Масса легких у самцов (А) и самок (В) крыс на 21 день эксперимента

Самцы, самки \*Контроль vs МКТ-Растворитель, МКТ-Se,  $p < 0,05$ , # самцы МКТ-Se и МКТ-Se-Убихинол,  $p < 0,05$ , one Way ANOVA.

Поскольку влияние убихинола на массу легких было неоднократно отмечено в экспериментах на самцах, то в заключительном эксперименте на самках было решено провести МРТ-исследование за два дня до острого эксперимента. МРТ двух крыс показаны на рис. 25. Фрагмент А представляет здоровую крысу, а фрагмент В – крысу с фиброзными изменениями в легких. На 1H МР-изображениях (верхние строки рис. 25) фиброз выявляется в виде белых пятен на ткани легких. Фиброзная ткань препятствует вентиляции газов, что визуализируется как потеря сигнала на 19F МР-изображениях (средние ряды) [111].



*Рис.25 МРТ двух крыс без (А) и с (В) фиброзом легких: выбранные срезы 1H (верхний ряд) и 19F (средний ряд) МРТ в корональной проекции, а также их наложение (нижний ряд). Красные стрелки указывают на фиброзные изменения в легких.*

МРТ-визуализация легких позволила выявить, что у животных из групп МКТ-Растворитель, МКТ-Se и МКТ-Se-Убихинол на 1H МРТ-изображениях фиброзные изменения легких отмечались почти у всех исследуемых животных. Кроме того, большинства животных с легочной гипертензией было отмечено нарушение вентилируемости (19F МРТ), независимо от наличия фиброзных очагов. Интересно отметить, что в экспериментальных группах нарушения перфузии чаще наблюдались преимущественно в одной доле легких, в то время как другая



перфузировавалась лучше. У животных группы МКТ-Убихинол фиброз легких наблюдался реже ( $p>0,05$ ), однако при визуальном сравнении с контрольными животными у них, как и у остальных гипертензивных животных, отмечалось нарушение вентилируемости (таб.17) [111].

**Таблица 17.** Общее количество животных с измененной структурой легких и нарушением вентилиации у самок крыс

Группа	1Н МРТ Признаки фибротических изменений	19F МРТ Нарушение вентилируемости
Контроль (n=4)	0	0
МКТ-Растворитель (n=4)	4 *	4 <sup>s</sup>
МКТ-Убихинол (n=4)	2	3 &
МКТ-Se (n=4)	4 *	4 <sup>s</sup>
МКТ-Se-Убихинол (n=4)	3 #	4 <sup>s</sup>

\*МКТ-Растворитель, МКТ-Se vs. Контроль,  $p<0,01$ , # МКТ-Se-Убихинол vs. Контроль,  $p<0,05$ ; <sup>s</sup>МКТ-Растворитель, МКТ-Se, МКТ-Se-Убихинол vs. Контроль,  $p<0,001$ , &МКТ-Убихинол vs. Контроль,  $p<0,01$ , Kruskal–Wallis H test.

При изучении реактивности легочных сосудов самок было показано, что при перфузии растворами серотонина отмечается существенно большая сократительная реакция в группе МКТ-Se начиная с концентрации  $1 \times 10^{-7}$ , а в группе МКТ-Растворитель с  $3 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-5}$  моль/л в сравнении с группой контроля и достигли максимальной точки  $10,0 \pm 2,2$  и  $16,5 \pm 5,2$  мм рт.ст. соответственно ( $p<0,05$ ) (рис.26.А) [111].

Максимальное эндотелий-зависимое расширение в ответ на перфузию растворами ацетилхолина было продемонстрировано в группе Контроля в концентрации  $10^{-9}$  моль/л и составило  $47 \pm 12,5\%$ . В группе МКТ-Se-Убихинол наибольшее расширение наблюдали при концентрации  $10^{-5}$  моль/л ( $38 \pm 33\%$ ). Ввиду существенных отклонений в реакциях изолированных сегментов легочных артерий отдельных животных, различий между группами показано не отмечено (рис.26.В) [111].

Эндотелий-независимое расширение в ответ на перфузию растворами нитропрусида натрия – донора оксида азота, показало похожую реакцию во всех экспериментальных группах, однако статистически достоверных отличий в расширительной реакции не обнаружено (рис.26.С) [111].

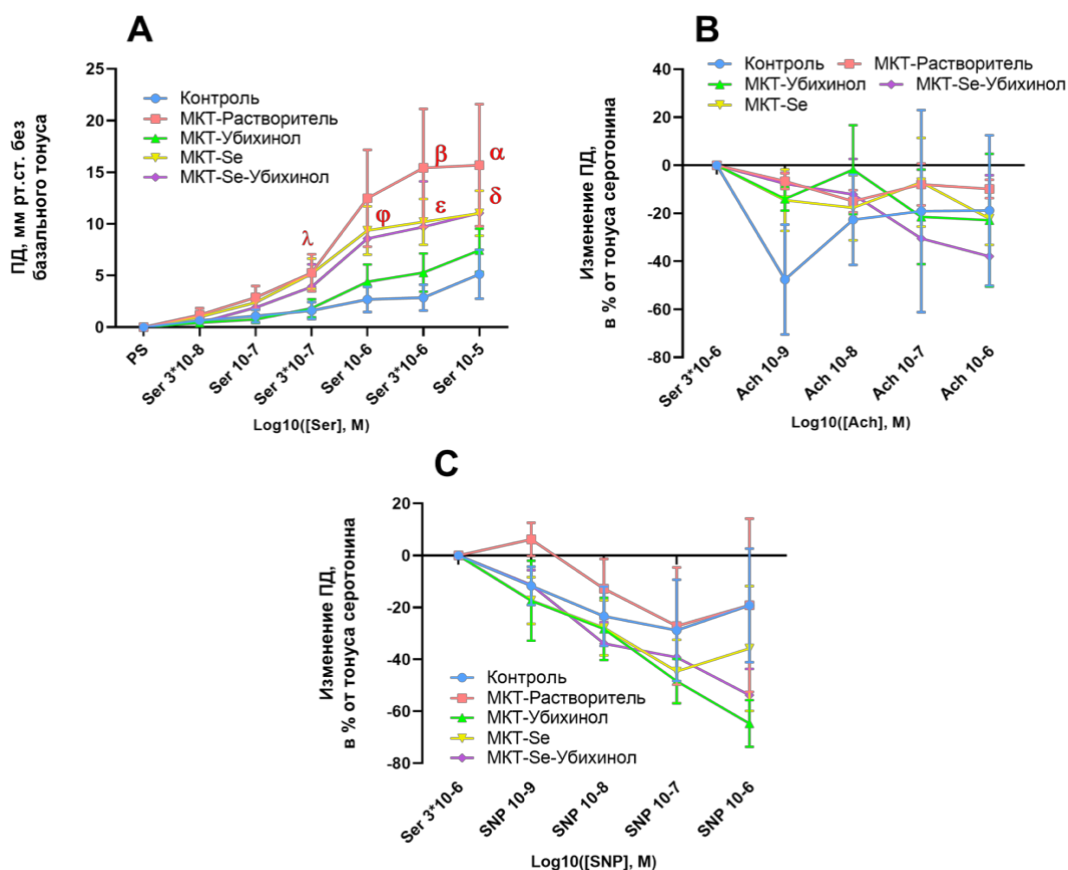


Рисунок 26. Реакция изолированных сегментов легочных сосудов самок на перфузию растворами (А) серотонина, (В) ацетилхолина, (С) нитропрусида натрия в различных концентрациях.

$\alpha, \beta$  MKT-Растворитель vs Контроль,  $p < 0,05$ ,  $\lambda, \varphi, \epsilon, \delta$  MKT-Se vs Контроль,  $p < 0,05$ , two way ANOVA

По результатам гематологических исследований уровень лейкоцитов у самцов в группе MKT-Убихинол был выше, чем в группе MKT-Se ( $p < 0,05$ ), а также достоверно отличался от аналогичной группы самок ( $p < 0,05$ ) (табл. 17.1). Внутри групп самок достоверных различий не было обнаружено. Во всех группах самок показатель среднего объема эритроцита был в среднем на 6% больше такового у самцов ( $p < 0,05$ ). Также среднее содержание гемоглобина и его среднее содержание и концентрация в эритроците у самок были достоверно выше, чем у аналогичных групп самцов ( $p < 0,05$ ) (табл.17.2). Данное различие можно рассматривать как зависимую от пола реализацию кислородной функции крови, коротая отмечена у здоровых животных и сохраняется при развитии изучаемой патологии [111].

**Таблица 17.1.** Гематологические показатели крови самцов и самок крыс на 21 день эксперимента

Название группы	n	Гематологический параметр, обозначение, единицы измерения			
		Лейкоциты, <i>WBC</i> , 10 <sup>9</sup> /L	Эритроциты, <i>RBC</i> , 10 <sup>12</sup> /L	Гемоглобин, <i>HGB</i> , g/L	Гематокрит, <i>HCT</i> , %
<b>Самцы</b>					
Контроль	8	15,9±5,9	8,28±0,5 <sup>#</sup>	150,9±16,2 <sup>\$</sup>	47,8±3,0 <sup>@</sup>
МКТ-Растворитель	6	12,9±3,3	7,92±0,6 <sup>#</sup>	155,2±7,8 <sup>\$</sup>	46,62±4,7 <sup>@</sup>
МКТ-Убихинол	5	19,0±2,7 <sup>*.β</sup>	8,5±1,0 <sup>#</sup>	155,0±12,0 <sup>\$</sup>	48,0±4,5 <sup>@</sup>
МКТ-Se	8	15,7±4,2	8,3±0,7	153,3±6,3 <sup>\$</sup>	46,3±1,8
МКТ-Se- Убихинол	7	11,2±4,1	8,3±1,1 <sup>#</sup>	157,4±7,6 <sup>\$</sup>	49,7±4,2 <sup>@</sup>
<b>Самки</b>					
Контроль	9	15,5±6,6	7,1±1,1	142,2±9,4	42,5±6,3
МКТ-Растворитель	6	17,75±6,2	6,9±0,7	146,7±14,1	42,8±3,1
МКТ-Убихинол	9	14,7±3,6	7,2±0,8	148,4±16,2	45,0±5,7
МКТ-Se	10	20,6±5,9	7,5±0,8	145,9±11,6	43,6±3,7
МКТ-Se- Убихинол	6	16,2±5,4	7,1±0,5	138,2±40,4	43,1±9,9

Самцы \*МКТ-Убихинол vs МКТ-Se-Убихинол,  $p < 0,05$ , one way ANOVA, Самцы vs самки <sup>β</sup>WBC, <sup>#</sup>RBC, <sup>\$</sup>HGB, <sup>@</sup>HCT,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test

**Таблица 17.2.** Гематологические показатели крови самцов и самок крыс на 21 день эксперимента.

Название группы	n	Гематологический параметр, обозначение, единицы измерения			
		Средний объем эритроцита, <i>MCV</i> , fL	Среднее содержание гемоглобина в эритроците, <i>MCH</i> , Pg	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, <i>MCHC</i> , g/L	Тромбоциты, <i>PLT</i> , 10 <sup>9</sup> /L
<b>Самцы</b>					
Контроль	8	56,5±2,5 <sup>*</sup>	18,9±1,7 <sup>#</sup>	318,0±16,2 <sup>\$</sup>	645,8±203,6
МКТ-Растворитель	6	56,4±2,9 <sup>*</sup>	18,6±1,1 <sup>#</sup>	317,8±7,8 <sup>\$</sup>	612,2±136,0
МКТ-Убихинол	5	58,4±2,3 <sup>*</sup>	19,2±0,7 <sup>#</sup>	324,2±10,3 <sup>\$</sup>	590,4±187,2
МКТ-Se	8	58,1±3,2 <sup>*</sup>	18,9±0,8 <sup>#</sup>	324,5±11,4	530,6±135,7
МКТ-Se- Убихинол	7	57,7±1,9 <sup>*</sup>	18,7±0,7 <sup>#</sup>	319,7±5,9 <sup>\$</sup>	545,0±208,0
<b>Самки</b>					
Контроль	9	62,1±1,8	21,1±1,6	329,6±11,0	631,6±119,5
МКТ-Растворитель	6	62,2±2,3	19,7±0,7	330,0±5,5	447,0±187,6
МКТ-Убихинол	9	63,5±3,9	20,3±1,2	341,2±15,4	422,0±141,5
МКТ-Se	10	61,9±2,5	20,1±1,5	325,8±7,9	524,6±147,2
МКТ-Se- Убихинол	6	61,3±2,2	20,7±0,8	327,4±4,6	603,5±221,4

Самцы vs самки: \**MCV*, <sup>\$</sup>*MCH*, <sup>\$</sup>*MCHC*,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney test

Важно отметить, что статистического увеличения СПЖД в сравнении с группами здоровых животных в группе МКТ-Se-Убихинол не было показано как у самцов, так и у самок, что говорит об отсутствии гипертензии по данному параметру. По сравнению с контролем гипертрофия была так же слабо выражена в обеих группах, получавших комбинацию селена и убихинола (МКТ-Se-Убихинол), что указывает на более выраженный протективный эффект такой комбинации в отношении развития МКТ-ЛГ по сравнению с использованием одного убихинола.

На снижение массы легких селен и убихинол оказали совместный эффект только у самцов, где не было зафиксировано никакой разницы в группе МКТ-Убихинол и МКТ-Se-Убихинол. В группе самок убихинол приводил к сопоставимости массы легких животных с МКТ-ЛГ и контрольных животных. В группах МКТ-Растворитель и МКТ-Se, вероятно, эндотелий сосудов был поврежден сильнее, о чем свидетельствует более выраженное сокращение при перфузии изолированных сегментов легочных сосудов растворами серотонина.

Таким образом, основываясь на результатах проведенных экспериментов можно заключить, что основной вклад в препятствии увеличения массы правого желудочка сердца и фиброза принадлежит убихинолу. Выявлены протективные свойства в отношении разрастания правого желудочка сердца и легких, а также подтвержден противовоспалительный эффект убихинола, который совместно с антиоксидантным эффектом, вероятно, лежит в основе наблюдаемых результатов. При этом оптимальным для исследования веществ является 3-недельная модель МКТ-ЛГ, так как именно на патологии средней тяжести возможно заметить эффекты, реализуемые на целом животном. Применение селена не оказало значимых влияний на течение патологии, а ее комбинация с убихинолом позволила сдержать нарастание СПЖД у самцов, чего не вызывает один убихинол [111].

Пол-зависимая регуляция реактивности изолированных легочных сосудов была выявлена как у нормотензивных животных, так и гипертензивных животных. У самцов контрольных животных показана более высокая реактивность к сосудосуживающему фактору – серотонину по сравнению с самками. Развитие МКТ-ЛГ сопровождается увеличением реактивности у самок к серотонину, а у самцов – уменьшением эндотелий-зависимого расширения. Убихинол нивелировал пол-зависимое изменение реактивности изолированных легочных сосудов к вазоактивным факторам, вызываемое развитием МКТ-ЛГ. У самок – наблюдается уменьшение реактивности к сосудосуживающему фактору серотонину. У самцов – увеличивается реактивность к эндотелий-зависимому расширительному фактору – АЦХ [1,111]. Все вышесказанное позволяет предположить, что выявленные изменения реактивности изолированных легочных сосудов под действием убихинола являются одним из механизмов реализации протективной роли убихинола в отношении развития МКТ-ЛГ. Другой возможный

механизм связан с подавлением воспаления, отмеченном в ткани правого желудочка сердца в виде снижения уровня экспрессии воспалительного маркера микроРНК-34а [112].

В большинстве групп была отмечена разница между самцами и самками в регуляции дыхательной функции крови – у самцов в большинстве групп увеличивались содержание гемоглобина, эритроцитов и гематокрит, а у самок наблюдалось увеличение среднего объема эритроцита и содержание в нем гемоглобина.

## ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

CoQ10, будучи необходимым компонентом дыхательной цепи митохондрий, участвует в обеспечении биоэнергетических процессов в клетках и обладает противовоспалительным и антиоксидантным действиями. С возрастом содержание эндогенного CoQ10 необратимо снижается, с чем ассоциируется высокий риск возникновения ряда сердечно-сосудистых заболеваний: согласно литературным данным, около 75% кардиологических пациентов имеют низкий уровень содержания CoQ10 в организме [152,215].

Селен представлен в организме человека в составе ряда ферментов, большинство из них также как и CoQ10 выполняет роль донора электронов в окислительно-восстановительных реакциях. Установлено, что недостаток селена также как и CoQ10 напрямую связан с развитием кардиологических патологий [9,39].

Оба исследуемых вещества, убихинол (восстановленная форма CoQ10) и селен, обладают схожими свойствами и, согласно некоторым исследованиям [30,33], потенциально могут взаимно дополнять физиологические эффекты друг друга на экспериментальных моделях сопряженных с оксидативным стрессом и воспалением.

Целью настоящей научно-исследовательской работы явилось изучение эффектов внутривенно вводимой солюбилизированной формы убихинола и перорально вводимого порошка селена на модели монокроталин-индуцированной легочной гипертензии (МКТ-ЛГ). Известно, что легочная гипертензия (ЛГ) имеет половые особенности: среди женщин ЛГ встречается до 4 раз чаще, чем среди мужчин [10,12], в связи с чем для выявления различий в действии изучаемых веществ эксперименты проводились как на самцах, так и на самках.

### **Влияние солюбилизированного убихинола на течение монокроталин-индуцированной легочной гипертензии различной степени тяжести у самцов и самок крыс**

Одним из объектов исследования данной диссертационной работы был инновационный препарат солюбилизированного убихинола, обладающий высокой биодоступностью при внутривенном введении. Полученные методом ВЭЖХ данные подтверждают, что внутривенное применение данной лекарственной формы эффективно и позволяет пролонгированно создавать в организме концентрации многократно превышающие нативные.

Высокая биодоступность делает перспективным изучение эффектов высоких концентраций убихинола, создаваемых в организме, на различных патологических моделях, связанных с митохондриальной дисфункцией, оксидативным стрессом, воспалением и пр. Результаты исследования показали, что однократная подкожная инъекция водно-спиртового раствора монокроталина в дозе 60 мг/кг уже через 3 недели приводила к развитию легочной

гипертензии во всех экспериментальных МКТ-группах самцов и самок [1,111,112], о чем свидетельствуют менее интенсивный набор массы тела, увеличение значений СПЖД, гипертрофия ПЖ, а также признаки поражения легких у большинства животных в сравнении с нормотензивным [75,117].

Исходно в ходе роста животных интенсивность набора массы тела у здоровых самцов крыс была в 2 раза по сравнению с самками, что связано с преимущественным влиянием полового гормона тестостерона [99]. Развитие ЛГ сопровождалось достоверным снижением скорости набора массы тела большинства испытуемых животных начиная со 2 недели после инъекции МКТ как у самцов, так и самок. Однако, половое различие, отмеченное на здоровых животных, сохранялось также и у животных с МКТ-ЛГ. В отдельных случаях масса тела достигала значений меньше исходных, что коррелировало с увеличением массы ПЖ, легких и значений СПЖД, то есть с усугублением степени проявления болезни [111,112]. Потеря массы тела является следствием снижения функции легких в виду изменения их структуры: вследствие болезни возрастает потребность в кислороде, катаболизм превалирует над анаболизмом, снижается аппетит [100]. В случае другой тесно-связанной с ЛГ патологией – идиопатическим легочным фиброзом, потеря массы имеет те же причины и является прогностическим маркером при оценке состояния пациентов [100,109].

Основными проявлениями ЛГ, как упоминалось ранее, считаются прогрессирующее увеличение артериального давления в малом круге кровообращения и гипертрофия правого желудочка сердца [75,109]. Нами было показано, что в течение 3-х недель после инъекции МКТ у самцов и самок из групп МКТ-растворитель наблюдалось достоверное увеличение массы правого желудочка сердца по сравнению с контрольными животными, что указывает на развитие ЛГ у этих животных. В группах животных, которым вводили убихинол на фоне развития МКТ-ЛГ, достоверных отличий в величине массы правого желудочка этих и контрольных животных не наблюдалось, что указывает на протективный эффект убихинола на развитие ЛГ. Убихинол также предотвращал изменения в легких при ЛГ, что выражалось в уменьшении их массы и снижении частоты фиброзных повреждений. Данные эффекты могут быть опосредованы антиоксидантными и противовоспалительными свойствами убихинола, и способностью вещества сдерживать пролиферацию фибробластов, по-видимому, снижая уровень экспрессии гена *mTog* [136].

При этом увеличение длительности наблюдения с 3-х до 4-х недель у самцов приводило к более тяжелому развитию заболевания, о чем свидетельствует увеличение СПЖД в среднем на 10% [111,112]. Протективное влияние убихинола на массу ПЖ, отмеченное на 3х-недельной ЛГ у самцов [1,111] при тяжелой степени развития МКТ-ЛГ нивелировалось, однако отличие массы легких в сравнении со здоровыми животными по-прежнему не выявлялось [112].

Важно отметить, что развитие МКТ-ЛГ даже в течение 4х недель не сопровождалось увеличением частоты сердечных сокращений, среднего систолического и среднего системного артериального давления, что говорит об отсутствии эффектов при применении монокроталина в дозе 60 мг/кг в большом круге кровообращения [112].

Для изучения возможного механизма полученного на 3х-недельной модели МКТ-ЛГ протективного эффекта убихинола было проведено изучение реактивности изолированных сегментов легочных сосудов всех экспериментальных групп самцов и самок на сосудосуживающие и сосудорасширительные факторы [110].

В настоящее время имеется множество данных, подтверждающих роль серотонина в патологии ЛГ [124]. Серотониновая вазоконстрикция легочного сосуда опосредуется через рецептор 5-НТ1В и переносчик серотонина SERT+, через него же стимулируется и пролиферация гладкомышечных клеток [116,142]. Известно, что для легочных сосудов серотонин является основным фактором, участвующим в создании сосудистого тонуса и сосудистого сопротивления [60]. Исходно у самцов выявлена большая суживающая реакция на перфузию растворами серотонина, чем у самок. В результате развития 3х-недельной МКТ-ЛГ реактивность сосудов самцов и самок к действию серотонина возросла, что можно рассматривать как аргумент в пользу участия серотонина в патогенезе ЛГ. Препарат убихинола не повлияло на реактивность легочных сосудов самцов к серотонину – она не отличалась от группы МКТ-растворитель, а вот у самок наблюдалось достоверное снижение реактивности к серотонину в группе МКТ-Убихинол. Таким образом убихинол, не влияя на вклад серотонина в развитие МКТ-ЛГ у самцов, уменьшает его у самок (рис.13). Можно предположить, что убихинол, благодаря своим антиоксидантным и противовоспалительным свойствам [112,215] улучшает метаболическое состояние сосудистой стенки и способствует увеличению ее расширительного потенциала.

В связи с этим были исследованы эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые расширительные реакции легочных сосудов у животных во всех экспериментальных группах. У самцов было отмечено увеличение эндотелий-зависимого расширения на АЦХ (рис 14). У самок благодаря большому индивидуальному разбросу данных достоверных различий между группами в реакции на АЦХ выявлено не было. Возможно, это связано с разным гормональным статусом животных, так как известно, что женский половой гормон эстрадиол способен активировать синтез оксида азота при увеличении его концентрации в фазу эструса. Эффект увеличения эндотелий-зависимого расширения в легочных сосудах самцов, принимавших убихинол, по-видимому, связан с его способностью улучшать функцию эндотелия и способствовать расширению сосудов [95,110]. Находясь во внутренней мембране митохондрий, CoQ10 увеличивает выработку NO и его биодоступность [159], а также снижает его окисление.



Также было показано, что CoQ10 способен модулировать активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы (iNOS), обеспечивая оптимальный нетоксичный уровень NO [188].

Изучение эндотелий-независимого расширения в ответ на натропруссид натрия не выявило влияния убихинола на этот показатель ни у самцов, ни у самок [111].

Таким образом изучение влияния убихинола на реактивность изолированных сосудов легких у самцов и самок с МКТ-ЛГ выявило половые различия, выражающиеся в уменьшении реактивности к сосудосуживающему фактору –серотонину у самок и увеличению эндотелий-зависимого расширения у самцов. Полученные эффекты могут вносить свой вклад в эффект уменьшения развития 3-х недельной формы МКТ-ЛГ при действии убихинола [111].

Учитывая возможное влияние женского полового гормона на реактивность сосудов к вазоактивным факторам и тот фактор, что убихинол может опосредовать свое действие через изменение функции эндотелия дальнейшие исследования было проведены на самцах. При более тяжелом течении заболевания у самцов, вызванном 4х-недельной МКТ-ЛГ и увеличении кратности введения убихинола до 3 раз, было получено в группе МКТ- убихинол уменьшение вазоконстрикции в ответ на действие серотонина, и увеличение эндотелий-зависимого расширения. Для изучения вопроса о том, связаны ли эти изменения с противовоспалительным действием убихинола в этой серии экспериментов были исследованы некоторые маркеры воспаления [111].

В настоящее время активно изучается роль микро-РНК в патогенезе ЛГ, как конечных маркеров процессов, происходящих при развитии той или иной патологии. Выявлены микро-РНК, опосредующие пролиферацию и миграцию ГМК сосудов (микроРНК-21, микроРНК -124, микроРНК-17-92 и др.) [61,183,200]. Некоторые из них также участвуют в пролиферации эндотелиальных клеток и фибробластов. Для каждого из этих процессов выявлены специфические микро-РНК [43,211]. Отдельно выявлены группа микро-РНК, участвующих в реализации воспалительного процесса, сопровождающего ЛГ (микроРНК-124, микроРНК-223, микроРНК-34а, микроРНК-let-7с, микроРНК-132 и др.) [211]. Микро-РНК специфичные для воспалительного процесса при ЛГ изучены мало. В нашей работе на модели 4х-недельной МКТ-ЛГ для изучения возможного механизма влияния убихинола на процессы развития гипертрофии и воспаления, являющиеся факторами патогенеза МКТ-ЛГ, были проведены дополнительные исследования по оценке экспрессии микро-РНК в ткани правого желудочка сердца на фоне действия убихинола. Поскольку патогенез МКТ-индуцированной легочной гипертензии имеет значительные воспалительные и пролиферативные компоненты [43,211], микроРНК-21 была выбрана в качестве маркера гипертрофии ПЖ, а микроРНК-34а - в качестве индикатора воспаления в ткани ПЖ [31,79].

Уровень экспрессии микро-РНК-21, у животных с тяжелой степенью легочной гипертензии достоверно не отличался от группы гипертензивного контроля (МКТ-Растворитель), однако в обеих группах уровень экспрессии маркера пролиферации ПЖ достоверно увеличен. Данный факт согласуется с нашими данными об отсутствии влияния убихинола на степень гипертрофии ПЖ у крыс на фоне 4х-недельной МКТ-ЛГ [112].

В нашем исследовании уровень экспрессии микроРНК-34а в тканях ПЖ у животных, которым вводился трижды убихинол был выше, чем в группе негипертензивного контроля, но достоверно ниже, чем в группе МКТ-Растворитель [112].

Известно, что в патогенез ЛГ существенный вклад вносит повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 [76,91,178] и TNF- $\alpha$  [77,179]. Окислительный стресс, сопровождающий развитие ЛГ, активирует NF- $\kappa$ B, который, в свою очередь, увеличивает экспрессию TNF- $\alpha$  и IL-6 [46]. Стоит также отметить, что роль NO заключается, с одной стороны, в предотвращении активации NF- $\kappa$ B и последующей продукции воспалительных медиаторов, способствующих адгезии лейкоцитов [46] и активации макрофагов [46,47]. С другой стороны, АФК снижают биодоступность NO, что также способствует развитию воспаления в сосудистой стенке и повреждает эндотелий [67]. В этом контексте биологическое значение CoQ10 может определяться его возможной противовоспалительной активностью [162,196]. Мета-анализы подтверждают, что прием CoQ10 снижает уровень провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ , С-реактивный белок) [69,70,208]. Возможный противовоспалительный эффект CoQ10 объясняется ингибированием экспрессии NF- $\kappa$ B [195], что в свою очередь опосредовано антиоксидантным действием CoQ10 на АФК, которые в дальнейшем активируют экспрессию NF- $\kappa$ B.

Важно отметить, что уровень экспрессии микроРНК-21 прямо коррелировал с увеличением массы ПЖ ( $p < 0,05$ ). Для микроРНК-34а такой корреляции не обнаружено [112].

Таким образом, сравнение самцов и самок с МКТ-ЛГ показало, что убихинол при средней степени тяжести патологии предотвращает развитие гипертрофии правого желудочка сердца и уменьшает изменения в легких у животных обоих полов. Вероятно, в этот эффект могут вносить вклад выявленные изменения реактивности легочных сосудов, где у самцов при действии убихинола улучшается функция эндотелия, а у самок уменьшается реактивность гладкой мышцы к серотонину [1,111]. При более тяжелом течении у самцов пропадает протективный эффект на ткань правого желудочка, однако эффект, оказываемый на легкие, сохраняется [112]. При этом увеличение длительности наблюдения и кратности введения убихинола улучшало у самцов как функцию эндотелия, так и вызывало уменьшение реактивности гладкой мышцы к серотонину. Уменьшение экспрессии микроРНК-34 в группе

МКТ-Убихинол, позволяет предположить, что восстановление реактивности лёгочных сосудов может быть связано с уменьшением воспалительной реакции [112].

### **Влияние комбинации солюбилизованного убихинола и селена на течение 3-х недельной монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов и самок крыс**

В первой части работы основные эффекты применения солюбилизованного убихинола отмечались на 3х-недельной модели, на которой были выявлены половые различия реакции изолированных сегментов легочных сосудов и уменьшение гипертрофии ПЖ и изменений в легких при действии убихинола [1]. В связи с этим для продолжения исследования была выбрана именно 3х-недельная модель, то есть МКТ-ЛГ среднетяжелого течения.

Имеются убедительные данные об успешном применении CoQ10 в комбинациях с другими веществами при различных сердечно-сосудистых заболеваниях. Наиболее популярными являются сочетания CoQ10 с витаминами С, Е и D, L-аргинином и L-карнитином и др. [41,140,172]. Учитывая, что влияния убихинола на основной показатель развития ЛГ — величину СПЖД в предыдущем исследовании обнаружено не было, для продолжения было решено использовать комбинацию убихинола и селена — компонента антиоксидантных ферментов первой линии защиты. Это сочетание было выбрано в связи с тем, что оба препарата обладают антиоксидантными свойствами и можно предположить проявление аддитивного эффекта. Кроме того, в масштабном шведском исследовании под руководством Alehagen U. был обнаружен существенный кардиопротективный эффект комбинации селена с CoQ10. Было отмечено, что в группе, принимающей комбинацию селена и CoQ10, уровень маркеров NT-proBNP [29] и фактора Виллебранда [32] были значительно ниже, что указывает на меньший риск развития сердечной недостаточности и отражает нормальное состояние эндотелия сосудов. Более того, комбинация веществ способствовала снижению риска смерти от сердечно-сосудистых событий у пожилых людей более чем в два раза даже через 10 лет после прекращения приема [29].

Как и в предыдущих исследованиях самцы набирали массу почти в два раза быстрее, чем самки, что обусловлено анаболическим действием тестостерона у самцов. Этот эффект был выявлен в норме и сохранялся в ходе развития легочной гипертензии. Заболевание только уменьшало степень прибавки веса, что является одним из его признаков.

У самок внутривенное введение солюбилизованного убихинола или пероральный прием селена, или их сочетание не влияло на увеличение СПЖД, что свидетельствовало о том, что по этому показателю развитие МКТ-ЛГ в этих группах не отличалось от группы МКТ растворитель. У самцов уменьшение прироста СПЖД при развитии МКТ-ЛГ наблюдали только в группе с совместным приемом убихинола и селена. В этой группе животных в отличие от всех других величина СПЖД достоверно не отличалась от контрольной группы. В этой же группе

относительный вес ПЖ также не отличался от контроля [111]. Эти данные позволяют говорить, что МКТ-ЛГ в группе с применением убихинола и селена развивалась в меньшей степени. Как было описано ранее механизм наблюдаемого эффекта может быть также связан с антиоксидантным действием используемых препаратов что ведет к улучшению состояния эндотелия и увеличению расширительного потенциала легочных сосудов [70,103,206]. Эти данные подтверждаются результатами Kozaeva и соавт., где инкубация изолированных колец аорты у здоровых самцов крыс с исследуемой формой убихинола приводила к вазодилатации [108].

Однако, эффект убихинола в виде предотвращения возрастания СПЖД у самцов проявлялся только при его комбинации с селеном. Известно, что селен подавляет сигнальные пути, ответственные за экспрессию молекул адгезии: в экспериментах *in vivo* и *ex vivo* показано снижение экспрессии молекул клеточной адгезии 1-типа, молекул адгезии сосудистого эндотелия 1-типа и Р-селектина, ответственных за развитие воспалительной реакции в ткани эндотелия и его разрушении [120]. Кроме того, Se опосредует синтез функциональных селенопротеинов, таких как глутатион-пероксидазы и тиоредоксинредуктазы, относящихся к первой линии антиперекисной защиты и предотвращающих повреждающее действие активных форм кислорода и апоптоз эндотелиальных клеток [9,39]. В экспериментах Zhu и соавт. было отмечено достоверное снижение СПЖД и среднего давления в легочной артерии у мышей с МКТ-ЛГ при применении органического селена и нано-селена в дозе 30 мг/кг/день в сравнении с контролем МКТ [214]. В нашем же эксперименте селена не оказало подобного влияния, возможно, по причине использования меньшей дозы и грубодисперсного порошка селеноцистеина. Мы пытались оценить эффективность введения селена, который животные получали ежедневно в дозе 10 мкг/кг *per os* по активности глутатионпероксидазы (GPx) — селен-зависимого антиоксидантного фермента [9,39]. Согласно полученным данным, существует пол-зависимая разница в активности GPx. У самок во всех экспериментальных группах активность GPx была статистически значимо выше, чем у самцов, что соответствует данным литературы и свидетельствует об адекватности используемого метода определения активности GPx. [150,194]. Однако, разницы в активности фермента внутри групп самок не отмечена, в то время как у самцов в группах МКТ-Убихинол и МКТ-Se активность фермента была статистически значимо снижена, по сравнению с группой МКТ-Растворитель. Полученные результаты отличаются от данных других исследований [62]. Увеличенная активность GPx у самок не влияла на маркеры развития МКТ-гипертонии по сравнению с самцами, так же не было различий и в группе МКТ-Растворитель. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение уровня активности GPx в пределах от  $6.611 \pm 0.593$  до

10.880±1.792 мкмоль НАДФН/мин\*Vобразца не влияет на степень развития этой формы гипертонии [111].

Кроме того, половая разница в полученных результатах может быть связана с циклом эстрогена у самок крыс. Эстрогенный статус изменяет тканевое распределение и метаболизм селена. Уровень селена в крови и активность GPx положительно коррелировали с концентрацией эстрогена во время эстрального цикла крыс и менструального цикла человека [81]. Мы предполагаем, что эстрогенный статус влияет на распределение селена в тканях путем модуляции селенопротеина P, поскольку этот белок играет центральную роль в транспорте селена [212]. Продолжительность эстрального цикла у крыс Wistar составляет 5-6 дней, а проэструс длится 6-7 ч [81], поэтому высокое содержание эстрадиола и увеличение потребления тканями селена происходило лишь на 5-6% продолжительности цикла и, возможно, не привело к выраженным изменениям.

Несмотря на это, добавление селена к убихинолу привело к уменьшению степени развития МКТ-ЛГ по изменению величины СПЖД у самцов. Подобный эффект был получен при изучении степени гипертрофии ПЖ сердца, хотя зависимость этих эффектов от присутствия селена была разной [111].

Второй показатель развития МКТ-гипертонии – степень гипертрофии ПЖ была сопоставима как у самок, так и у самцов с МКТ-ЛГ. Среднее значение относительного веса правого желудочка крыс обоих полов в группах МКТ-убихинол и МКТ-убихинол+Se не отличалась от значений относительной массы ПЖ контрольных животных, т.е. по этому показателю у крыс этих групп гипертония развивалась в меньшей степени, в отличие от других групп, где гипертрофия правого желудочка была более выраженной [111].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что протективный эффект использования комбинации солюбилизованного убихинола и селена на степень гипертрофии ПЖ при МКТ-индуцированной ЛГ обусловлен в основном действием убихинола. Имеются данные о том, что убихинол, участвуя в подавлении пути NF-κB/TGF-β1/MMP-9, может предотвращать фиброзное перерождение тканей [137]. Кроме того, он способен вызывать снижение количества ET-1 – одного из факторов патогенеза ЛГ, вызывающего клеточную пролиферацию кардиомиоцитов [169,170,215].

Существует возможный механизм, с помощью которого селен может дополнять действие убихинола у самцов. Он связан с его включением в глутатион-пероксидазы и тиоредоксин-редуктазы, а также репарацией других антиоксидантных ферментов в том числе супероксид-дисмутазы [9,39]. Zamani Moghaddam соавт. в своем исследовании оценивали влияние органического селена и наноселена, добавленных в кормовые смеси цыплят бройлеров в дозе 0,3 мг/кг. Через 5 недель наблюдения было показано, что добавление наноселена

достоверно уменьшает гипертрофию правого желудочка сердца (ПЖ/масса сердца), ослабляя симптомы ЛГ. Авторы предполагают, что механизмы, лежащие в основе такого действия, включают снижение перекисного окисления липидов в печени, иммуномодуляцию и улучшение морфологии кишечных ворсинок [22]. В уже упомянутом ранее эксперименте Mo-Li Zhu и соавт. Добавление органического селена приводило к достоверному снижению гипертрофии у мышей с 3х-недельной МКТ-ЛГ, однако авторы не приводят аргументов, объясняющий подобный эффект [214]. Однако в наших экспериментах при использовании пероральной дозы селена 10 мкг/кг, выраженного влияния на активность глутатионпероксидазы отмечено не было.

Наряду с гипертрофией правого желудочка легочная гипертензия часто сопровождается появлением фиброзной (рубцовой) ткани в легких, что приводит к нарушениям дыхательной функции. Повреждение клеток такими агентами как монокроталин-пиролл ведет не только к повышенному синтезу провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  [201,204], но и одного из ведущих факторов фиброгенеза – фактора роста соединительной ткани (CTGF) [45], который ответственен за разрастание фибробластов. Изменения в структуре и стойкое сужение сосудистой стенки препятствуют адекватной вентиляции и перфузии легких, вследствие чего наблюдается частое и неглубокое дыхание, снижение аппетита и веса животных [173]. Так как эксперименте на самцах не было продемонстрировано достоверного увеличения массы легких в группах МКТ-Убихинол и МКТ-Se-Убихинол, то в последующем эксперименте на самках для проверки состояния легких и предположения о влиянии убихинола, была проведена магнитно-резонансная томография (МРТ) легких с целью определения фиброзных и невентилируемых участков. Таким образом было установлено, что фиброз и нарушение вентиляции в группах гипертензивного контроля - МКТ-Растворитель и МКТ-Se встречались чаще, чем в группах МКТ-Убихинол, где фиброз наблюдался только в половине исследованных случаев, однако нарушение вентиляции по-прежнему выявлялось. Данный эффект может быть реализован в том числе через развитие воспаления в очаге действия монокроталин-пиррола [80], а также за счет ингибирования сигнального пути m-TOR и увеличения экспрессии маркеров аутофагии, как было показано в работах Mohamed и соавт.. Кроме того, непосредственно CoQ10 может подавлять и синтез CTGF препятствуя пролиферации, миграции, и адгезии клеток в легочной ткани [146], что, вероятно, объясняет снижение массы легких в группах самцов и самок, которым вводили только убихинол и самцов, получавших комбинацию двух веществ. В группе самок селен, вероятно, нивелировал действие убихинола. Литературных источников, дающих представление о механизме такого эффекта на легкие нет, однако, это может быть связано с увеличением экспрессии селенопротеина Р при легочной гипертензии, что имеет прогностическое значение [104]. Однако, вопрос о том,

приводит ли дополнительный прием селена к утяжелению МКТ-ЛГ и существует ли дозозависимость эффекта селена пока не изучен.

Важно отметить, что при гематологическом исследовании было выявлено, что в большинстве групп присутствует разница между самцами и самками в регуляции дыхательной функции крови: у самцов отмечали увеличение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, а у самок наблюдалось увеличение среднего объема эритроцита. Особая форма эритроцитов способствует выполнению ими основной функции – переноса дыхательных газов, так как при увеличении среднего объема эритроцита диффузионная поверхность увеличивается, это позволяет ему содержать большую концентрацию гемоглобина. Данное различие согласуется с литературными данными и существует во всех группах, независимо от наличия патологии или применяемых веществ.

Таким образом, селен вводимый внутрижелудочно ежедневно не повлиял на основные маркеры легочной гипертензии, но рост самцов в период с 14 по 21 дни остановился. У самцов также был отмечен больший вес легких по сравнению с группой, принимавшей комбинацию веществ. У самок отмечалась большая чувствительность к серотонину, что свидетельствует о повреждении сосудов в данной группе. Исходя из этого можно сделать вывод, что применение только селена не оказало значимого влияния на течение патологии.

Комбинация убихинола с селеном на 3х-недельной МКТ-ЛГ в наших экспериментах предотвращало значимое нарастание СПЖД у самцов, но не у самок крыс. Снижение относительной массы правого желудочка т.е. гипертрофии, также как и при действии одного убихинола, наблюдалось у всех животных, в том числе и при его комбинации с селеном. Протективный эффект на легких в виде снижения их массы, неоднократно отмечавшийся в группе убихинола, при применении его комбинации с селеном, был также отмечен только у самцов. Ежедневное внутрижелудочное применение селена в дозе 10 мкг/кг, вероятно, не приводит к достоверному увеличению активности GРх, в связи с чем не оказывает выраженного эффекта на основные диагностические признаки развития МКТ-ЛГ.

## ВЫВОДЫ

1. Протективное действие препарата убихинола, вводимого внутривенно в дозе 30 мг/кг в отношении монокроталин-индуцированной легочной гипертензии проявляется в предупреждении увеличения массы правого желудочка сердца у самцов и у самок крыс стока Wistar при 3-недельной форме монокроталин-индуцированной легочной гипертензии. На модели более тяжелой формы заболевания этот эффект не проявляется. Комбинация убихинола с селеном, вводимым внутривенно в дозе 10 мг/кг, также оказывает протективное действие, предупреждает увеличение систолического давления в правом желудочке сердца у самцов. Применение одного селена в используемой дозе не влияет на степень развития легочной гипертензии.
2. Препарат убихинола, вводимый внутривенно в дозе 30 мг/кг, восстанавливает реактивность изолированных легочных сосудов, измененную в ходе развития монокроталин-индуцированной легочной гипертензии. У самок уменьшается констрикторная реакция легочных сосудов на серотонин, у самцов увеличивается степень эндотелий-зависимого расширения.
3. Препарат убихинола, вводимый внутривенно в дозе 30 мг/кг, предупреждает возрастание степени фиброзного повреждения легких у самок и самцов крыс по сравнению с группой животных, его не получавших. У самок убихинол предупреждает нарушение вентиляции легких.
4. Убихинол на модели тяжелой формы монокроталин-индуцированной легочной гипертензии у самцов вызывает снижение экспрессии маркера воспаления микроРНК-34а и восстанавливает реактивность эндотелий-зависимого расширения сосудов, что может рассматриваться как возможные механизмы его протективного действия в отношении развития патологии.
5. Половые различия эффектов препарата убихинола, вводимого внутривенно в дозе 30 мг/кг, на развитие монокроталин-индуцированной легочной гипертензии выявлены в реактивности сосудов к вазоактивным факторам: у самцов выявляется восстановление функции эндотелия, а у самок снижение констрикции к главному сосудосуживающему агенту в легких – серотонину. Положительный эффект комбинации препарата убихинола, вводимого внутривенно в дозе 30 мг/кг, и селена, вводимого внутривенно в дозе 10 мг/кг, проявлялся в виде снижения систолического давления в правом желудочке сердца и массы легких был выражен у самцов, но не у самок.



### **Практические рекомендации**

Полученные в ходе выполнения настоящей научно-исследовательской работы данные по изучению эффектов 1% раствора солюбилизованного убихинола и его комбинации с селеном на фоне легочной гипертензии различной степени тяжести у самцов и самок крыс могут быть использованы при планировании дальнейших доклинических и клинических исследований, а также могут пополнить терапевтические рекомендации для применения препаратов убихинола с высокой биодоступностью для в качестве профилактической и адъювантной терапии не только легочной гипертензии, но и других кардиологических патологий, связанных с оксидативным стрессом и дисфункцией эндотелия.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД/сАД/сисАД	Артериальное давление/среднее артериальное давление/систолическое артериальное давление	ГФ	Государственная фармакопея
		ЕТ-1	Эндотелин-1
		ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
АО НПО	Акционерное общество Научно-практическая организация	ER $\alpha$ / $\beta$	Эстрадиоловый рецептор $\alpha$ / $\beta$
АТФ	Аденозинтрифосфорная кислота	ИВЛ	Искусственная вентиляция легких
АФК	Активные формы кислорода	ЛГ	Легочная гипертензия
АЦХ	Ацетилхолин	ЛПВП	Лipoproteины высокой плотности
БАДы	Биологически-активные добавки	ЛПНП	Лipoproteины низкой плотности
ВАК	Высшая аттестационная комиссия	ЛПОНП	Лipoproteины очень низкой плотности
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека	МикроРНК	Микрофрагменты рибонуклеиновой кислоты
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения	МКТ	Монокроталин
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография	МКТ-ЛГ	Монокроталин-индуцированная легочная гипертензия
ГМГ-КоА-Редуктаза	3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А редуктаза	ММР-9	Матриксная металлопротеиназа 9
ГМК	Гладкомышечные клетки	МРТ	Магнитно-резонансная томография
ГОСТ	Государственный стандарт	МСР-1	Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1
ГПЖ	Гипертрофия правого желудочка	НАДФ/ NADPH	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОФЦБ	Октафторциклобутан	CYP3A4	Цитохром P450 3A4
ПЖ	Правый желудочек	FA	Угол отклонения намагниченности
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция в реальном времени	GPx	Глутатионпероксидаза
СПЖД	Систолическое давление в правом желудочке сердца	GSH	Глутатион восстановленный
СПИД	Синдром приобретенного иммунодефицита	GSSG	Окисленный глутатион
ср.АД	Среднее артериальное давление	HCT	Гематокрит
ССЗ	Сердечно-сосудистые заболевания	HGB	Гемоглобин
ССА	Соединенные Штаты Америки	hs-CRP	Высокочувствительный С-реактивный белок
ТЕ	Время эхо	IL	Интерлейкин
TGF- $\beta_1$	Трансформирующий фактор роста $\beta_1$	iNOS	Индукцибельная синтаза оксида азота
ЧСС	Частота сердечных сокращений	MCHC	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците
ЭКГ	Электрокардиограмма	MCV	средний объем эритроцита
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс	mTOR	Мишень рапамицина у млекопитающих
ANOVA	Дисперсный анализ	Nf- $\kappa\beta$	Ядерный фактор $\kappa\beta$
VMPR II	рецептор костного морфогенетического белка II типа	NO	Оксид азота
CoQ10	Коэнзим Q10	Nt-pro-BNP	Мозговой натрийуретический пептид
CTGF	Фактор роста соединительной ткани	NYHA	Классификация Нью-Йоркской кардиологической ассоциации
CVB3/0	Коксакивирус В3	РАЕС	Эндотелиальные клетки легочной артерии
		РАИ	Ингибитор активатора плазминогена

PGI <sub>2</sub>	Простаглицлин	Ser	Серотонин
pH	Водородный показатель	SERT+	Переносчик серотонина
PLT	Тромбоциты	SNP	Нитропруссид натрия
QRS /QRS-T	Комплекс на ЭКГ, состоящий из зубцов Q, R и S/T	T4/T3	Тироксин/Трийодтиронин
RBC	Эритроциты	TNF- α	Фактор некроза опухоли-α
SD	Стандартное отклонение	TR	Время повторения
SEM	Ошибка среднего	VWF	Фактор Виллибрандта
SeP	Селенопротеин	WBC	Лейкоциты

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает искреннюю благодарность:

*Медведеву Олегу Стефановичу*, д.м.н., профессору, заведующему кафедрой фармакологии факультета фундаментальной медицины и *Медведевой Наталии Александровне*, д.б.н., профессору, в.н.с. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за чуткое руководство, вдохновляющую поддержку, помощь и сопровождение на всех этапах выполнения диссертационного исследования;

*Артемьевой Марине Михайловне*, к.б.н., с.н.с. кафедры физиологии человека и животных за помощь в освоении методик и выполнении экспериментов;

*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 анализа данных;

*Пирогову Юрию Андреевичу*, д.ф.-м.н., профессору кафедры фотоники и физики микроволн физического факультета, а также сотрудникам лаборатории магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова к.ф.-м.н. *Гуляеву Михаилу Владимировичу* и к.ф.-м.н. *Павловой Ольге Сергеевне* за отзывчивость и содействие в экспериментальной работе;

Всем сотрудникам кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины и кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за ценные советы, всестороннюю помощь и положительное отношение;

Родным и друзьям за всестороннюю поддержку.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Ш.П. Эффект внутривенного введения убихинола на развитие монокроталиновой формы легочной гипертензии в экспериментах на крысах // Экспериментальная и клиническая фармакология / Ш.П. Абдуллаев, Т.А. Куропаткина, Н.В. Панькова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т.85. №5. – Р. 20–23.
2. Голубкина Н.А. Селен в питании: растения, животные, человек / Н.А. Голубкина, Т.Т. Папазян. – Москва: Печатный город, – 2007. – 254 с.
3. 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 [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. № 52. – Р. 12–15.
4. Каленикова Е.И. Доклиническое изучение фармакокинетики инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения [Текст] / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.Ю. Куляк [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – V.11. № 51. – Р. 3–7.
5. Каленикова Е.И. Сравнение кардиопротекторной эффективности коэнзима Q10 и мексикора при экспериментальной ишемии миокарда [Текст] / Е.И. Каленикова, О.Г. Токарева, О.Ю. Куляк [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т.78. №6. С. 12-14.
6. Каталанова А.В. Оценка кардиопротекторного действия убихинола на модели реперфузионного повреждения миокарда крыс [Текст] / А.В. Каталанова, В.Г. Макаров, Н.М. Фаустова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2018. –V.64. – Р. 188–194.
7. Ключников С.О. Убихинон (Коэнзим Q10): теория и клиническая практика [Текст] / С.О. Ключников, Е.С. Гнетнева // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2008. – V.87. №3. С. 103-110.
8. Композиция убихинола для парентерального введения и способ её получения: пат. RU2635993C1 Рос. Федерация: 2017-11-17.
9. Куропаткина Т.А. Роль селена в кардиологии [Текст] / Т.А. Куропаткина, Н.А. Медведева, О.С. Медведев // Кардиология. – 2021. –Т.3. №61. – С. 96–104.
10. Медведева Н.А. Гендерные различия в проявлении легочной гипертензии. Влияние женского полового гормона эстрадиола [Текст] / Н.А. Медведева, Н.В. Панькова, М.М. Артемьева // Артериальная гипертензия. – 2017. – V.23. №5. – Р. 421–433.
11. Павлова О.С. Разработка новых методов магнитно-резонансной томографии на ядрах фтора-19. Дис. к. физ.-мат. н.: 03.01.02, 03.01.08 [Текст] / О.С. Павлова // Москва. – 2021. – С. 113.

12. Панькова Н.В.  $17\beta$ -Эстрадиол уменьшает чувствительность изолированных легочных сосудов к серотонину у овариэктомированных самок крыс с гипоксической формой легочной гипертензии / Н.В. Панькова, М.М. Артемьева, Н.А. Медведева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. Т.82. №2. С. 7–10.
13. Полубояринов В.И. Метаболизм и механизм токсичности селенсодержащих препаратов, используемых для коррекции дефицита микроэлемента селена [Текст] / В.И. Полубояринов Д.Г. Елистратов, В.И. Швец // Тонкие химические технологии. – 2019. – V.1. №14. – P. 4-24.
14. Решетник Л.А. Обеспеченность селеном жителей некоторых городов Иркутской области [Текст] / Л.А. Решетник, Е.О. Парфенова, Н.А. Голубкина // Сибирский медицинский журнал. – 1999. №3. – С. 16–22.
15. Сенькевич О.А. Обеспеченность селеном жителей Хабаровского края [Текст] / О.А. Сенькевич, Н.А. Голубкина, Ю.Г. Ковальский // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. №1. – P. 82–84.
16. Степанов Ю.М. Селен как микроэлемент: характеристика и значение для человека [Текст] / Ю.М. Степанов, В.В. Белицкий, С.В. Косинская // Сучасна гастроентерологія. – 2012. Т. 65 №3. – P. 91–96.
17. Третьяк Л.Н. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания [Текст] / Л.Н. Третьяк, Е.М. Герасимов // Вестник ОГУ. – 2007. №12. – P. 130–145.
18. Харитонова Е.В. Фармакокинетика солюбилизированного CoQ10 в составе препарата кудесан при парентеральных путях введения [Текст] / Е.В. Харитонова, Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – Т.6. №84. – С. 26–29.
19. Чазова И.Е. Евразийские клинические рекомендации по диагностике и лечению легочной гипертензии. И.Е. Чазова, Т.В. Мартынюк, З.С. Валиева [и др.] // Евразийский Кардиологический Журнал. – 2020. №1. С. 78-122.
20. Чазова И.Е. Легочная гипертензия / И.Е. Чазова, Т.В. Мартынюк // — Москва. Практика. 2015. – 928с.
21. Åberg F. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues / F. Åberg, E.L. Appelkvist, G. Dallner [et al.] // Arch Biochem Biophys. – 1992. –V. 295. №2. – P. 230–234.
22. Adarsh K. Coenzyme Q10 (CoQ10) in isolated diastolic heart failure in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) [Text] / K. Adarsh, H. Kaur, V. Mohan // Biofactors. – 2008. –V.32. №1-4. – P. 145–149.

23. Adesina S.E. Targeting mitochondrial reactive oxygen species to modulate hypoxia-induced pulmonary hypertension [Text] / S.E. Adesina, B.Y. Kang, K.M. Bijli [et al.] // *Free Radical Bio Med.* – 2015. – V.87. – P. 36–47.
24. Aggarwal D. Pulmonary hypertension as a prognostic factor in idiopathic pulmonary fibrosis [Text] / D. Aggarwal, P. Aggarwal // *Respiration.* – 2013. – V.85. №6. – P. 521–521.
25. Al-Mawali A. Non-communicable diseases: shining a light on cardiovascular disease, oman's biggest killer / A. Al-Mawali // *Oman Medical J.* – 2015. – V.30. №4. – P. 227–228.
26. Alanne M. Variation in the selenoprotein S gene locus is associated with coronary heart disease and ischemic stroke in two independent Finnish cohorts [Text] / M. Alanne, K. Kristiansson, K. Auro [et al.] // *Hum Genet.* – 2007. – V.122. №3–4. – P. 355–365.
27. Alehagen U. Less fibrosis in elderly subjects supplemented with selenium and coenzyme Q10—A mechanism behind reduced cardiovascular mortality? [Text] / U. Alehagen, J. Aaseth, J. Alexander [et al.] // *Biofactors.* – 2018. – V.44. №2. – P. 137–147.
28. Alehagen U. Less increase of copeptin and MR-proADM due to intervention with selenium and coenzyme Q10 combined: Results from a 4-year prospective randomized double-blind placebo-controlled trial among elderly Swedish citizens [Text] / U. Alehagen, J. Aaseth, P. Johansson [et al.] // *Biofactors.* – 2015. – V.41. №6. P. 443–452.
29. Alehagen U. Reduced cardiovascular mortality 10 years after supplementation with selenium and coenzyme Q10 for four years: follow-up results of a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial in elderly citizens [Text] / U. Alehagen, J. Aaseth, P. Johansson // *Plos One.* – 2015. – V.10. №12. – P. e0141641.
30. Alehagen U. Selenium and coenzyme Q10 interrelationship in cardiovascular diseases – A clinician's point of view [Text] / U. Alehagen, J. Aaseth // *J Trace Elem Med Bio.* – 2015. – V.31. – P. 157–162.
31. Alehagen U. Significant changes in circulating microRNA by dietary supplementation of selenium and coenzyme Q10 in healthy elderly males. A subgroup analysis of a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial among elderly Swedish citizens [Text] / U. Alehagen, P. Johansson, J. Aaseth [et al.] // *Plos One.* – 2017. – V. – 12. №4. – P. e0174880.
32. Alehagen U. Significant decrease of von Willebrand factor and plasminogen activator inhibitor-1 by providing supplementation with selenium and coenzyme Q10 to an elderly population with a low selenium status / U. Alehagen, J. Alexander, J. Aaseth [et al.] // *Eur J Nutr.* – 2020. – V.59. №8. – P. 3581–3590.
33. Alehagen U. Still reduced cardiovascular mortality 12 years after supplementation with selenium and coenzyme Q10 for four years: A validation of previous 10-year follow-up results of a



- prospective randomized double-blind placebo-controlled trial in elderly [Text] / U. Alehagen, J. Aaseth, J. Alexander [et al.] // *Plos One*. – 2018. – V.13. №4. – P. e0193120.
34. Ardanaz N. Lack of glutathione peroxidase 1 accelerates cardiac-specific hypertrophy and dysfunction in angiotensin ii hypertension [Text] / N. Ardanaz, X.P. Yang, M. E Cifuentes [et al.] // *Hypertension*. – 2010. – V.55. №1. – P. 116–123.
35. Arenas-Jal M. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges [Text] / M. Arenas-Jal, J. M. Suñé-Negre, E. García-Montoya // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2020. – V.2. №19. – P. 574–594.
36. Augustine D.X. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography [Text] / D.X. Augustine, L.D. Coates-Bradshaw, J. Willis [et al.] // *Echo Res Pract*. – 2018. – V.5. №3. – P. G11–G24.
37. Bansal M.P Selenium, a versatile trace element: current research implications [Text] / M.P. Bansal, P. Kaur // *Indian J Exp Biol*. – 2005. – V.43. №12. – P. 1119–1129.
38. Beck M. Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity [Text] / M. Beck // *J Am Coll Nutr*. – 2001. – V.20. №5. – P. 384S-388S.
39. Benstoem C. Selenium and its supplementation in cardiovascular disease—what do we know? [Text] / C. Benstoem, A. Goetzenich, S. Kraemer [et al.] // *Nutrients*. – 2015. – V.7. №5. – P. 3094–3118.
40. Bergamini C. A water soluble CoQ10 formulation improves intracellular distribution and promotes mitochondrial respiration in cultured cells [Text] / C. Bergamini, N. Moruzzi, A. Sblendido [et al.] // *Plos One*. – 2012. – V.7. №3. – P. e33712.
41. Bertelli A. L-carnitine and coenzyme Q10 protective action against ischaemia and reperfusion of working rat heart [Text] / A. Bertelli, F. Ronca, G. Ronca [et al.] // *Drug Exp Clin Res*. – 1992. – V.18. №10. – P. 431–436.
42. Bhagavan H.N. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics [Text] / H.N. Bhagavan, R.K. Chopra // *Free Radical Res*. – 2009. – V.40. №5. – P. 445–453.
43. Boucherat O. microRNA: medical evidence, from molecular biology to clinical practice [Text] / O. Boucherat, F. Potus, S. Bonnet // *Adv Exp Med Biol*. – 2015. – Vol.888. – P. 237–252.
44. Brown K. Selenium, selenoproteins and human health: a review [Text] / K. Brown, J. Arthur // *Public Health Nutr*. – 2001. – V.4. №2b. – P. 593–599.
45. Chang C.Y. Magnesium sulfate mitigates the progression of monocrotaline pulmonary hypertension in rats [Text] / J.J. Chang, R. Armonda, N. Goyal [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V.20. №18. – P. 4622.

46. Chen X.L. Rac1 and Superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in endothelial cells [Text] / X.L. Chen, Q. Zhang, R. Zhao [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2003. – V.305. №2. – P. 573–580.
47. Chen X.L. Superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and iron are required for TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase [Text] / X.L. Chen, Q. Zhang, R. Zhao [et al.] // *Am J Physiol-heart C.* – 2004. – V.286. №3. – P. H1001–H1007.
48. Christman B.W. An Imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension [Text] / B.W. Christman, C.D. McPherson, J.H. Newman [et al.] // *New Engl J Medicine.* – 1992. – V.327. №2. – P. 70–75.
49. Crane F.L. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria [Text] / F.L. Crane, Y. Hatefi, R.L. Lester [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1957. – V.25. №1. – P. 220–221.
50. Culley M.K. Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: beyond mountains there are mountains [Text] / M.K. Culley, S.Y. Chan // *J Clin Invest.* – 2018. – V.128. №9. – P. 3704–3715.
51. De Blasio M.J. Therapeutic targeting of oxidative stress with coenzyme Q10 counteracts exaggerated diabetic cardiomyopathy in a mouse model of diabetes with diminished PI3K(p110 $\alpha$ ) signaling [Text] / M.J. De Blasio, K. Huynh, C. Qin [et al.] // *Free Radical Bio Med.* – 2015. V.87. – P. 137–147.
52. De Raaf M.A. SuHx rat model: partly reversible pulmonary hypertension and progressive intima obstruction [Text] / M.A. Raaf, I. Schaliq, J. Gomez-Arroyo [et al.] // *Eur Respir J.* – 2014. –V.44. №1. – P. 160–168.
53. Delbosc S. Statins, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, are able to reduce superoxide anion production by nadph oxidase in thp-1-derived monocytes [Text] / S. Delbosc, M. Morena, F. Djouad [et al.] // *J Cardiovasc Pharm.* – 2002. – V. 40. № 4. – P. 611–617.
54. DeMarco V.G. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension [Text] / V.G. Demarco, A.T. Whaley-Connell, J.R. Sowers [et al.] // *World J Cardiol.* – 2010. –V.2. №10. – P. 316–324.
55. Diaz-Castro J. Beneficial effect of ubiquinol on hematological and inflammatory signaling during exercise [Text] / J. Diaz-Castro, J. Moreno-Fernandez, I. Chiroso [et al.] // *Nutrients.* – 2020. – V.12. №2. – P. 424.
56. Dumitrascu R. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury [Text] / R. Dumitrascu, S. Koebrich, E. Dony [et al.] // *Bmc Pulm Med.* – 2008. – V.8. №1. – P. 25–25.
57. Engeli S. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women [Text] / S. Engeli, M. Feldpausch, K. Gorzelniak // *Diabetes.* – 2003. – V.52. №4. – P. 942–947.

58. Espinola-Klein C. Glutathione Peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis [Text] / C. Espinola-Klein, H.J. Rupprecht, C. Bickel [et al.] // *Am J Cardiol.* – 2007. – V.99. №6. – P. 808–812.
59. Fairweather-Tait S.J. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements [Text] / S. J. Fairweather-Tait, R. Collings, R. Hurst // *Am J Clin Nutrition.* – 2010. – V. 91. № 5. – P. 1484S-1491S.
60. Fanburg B.L. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen [Text] / B.L. Fanburg, S.L. Lee // *Am J Physiol-lung C.* – 1997. – V.272. №5. – P. L795–L806.
61. Fang L.-L. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review) [Text] / L.L. Fang, X.H. Wang, B.F. Sun [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2017. – V.40 №6. – P. 1624–1630.
62. Farahmand F. Role of oxidative stress versus lipids in monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right heart failure [Text] / F. Farahmand, A. Malik, A. Sharma [et al.] // *Physiological Reports.* – 2021. – V.9. №22. – P. e15090.
63. Farber H.W. Mechanism of disease: Pulmonary hypertension [Text] / H.W. Farber, J. Loscalzo // *Discov Med.* – 2005. – V.5. №25. – P. 80–87.
64. Folkers K. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans [Text] / K. Folkers, P. Langsjoen, R. Willis [Text] // *Proc National Acad Sci.* – 1990. – V.87. №22. – P. 8931–8934.
65. Forsmark-Andrée P. Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation [Text] / P. Forsmark-Andrée, L. Ernster // *Mol Aspects Med.* – 1994. – V.15. – P. s73–s81.
66. Frump A.L. Estradiol improves right ventricular function in rats with severe angioproliferative pulmonary hypertension: effects of endogenous and exogenous sex hormones [Text] / A.L. Frump, K.N. Goss, A. Vayl [et al.] // *Am J Physiol-lung C.* – 2015. – V.308. №9. – P. L873–L890.
67. Fulton D. Reactive oxygen and nitrogen species in the development of pulmonary hypertension [Text] / D. Fulton, X. Li, Z. Bordan [et al.] // *Antioxidants.* – 2017. – V.6. №3. – P. 54.
68. Galiè N. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the european society of cardiology (ESC) and the european respiratory society (ERS): Endorsed by: association for european paediatric and congenital cardiology (AEPC), international society for heart and lung transplantation (ISHLT) [Text] / N. Galiè, M. Humbert, J.L. Vachiery [et al.] // *Eur Heart J.* – 2016. – V.37. №1. – P. 67–119.

69. Gao, HL. Oral CoQ10 attenuates high salt-induced hypertension by restoring neurotransmitters and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus [Text] / H.L. Gao, X.J. Yu, J. Qi [et al.] // – Sci Rep. –2016. V.6. –P.30301.
70. Gao L. Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials [Text] / L. Gao, Q. Mao, J. Cao [et al.] // Atherosclerosis. – 2012. – V.221. №2. – P. 311–316.
71. Ghofrani H.A. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond [Text] / H.A. Ghofrani, I.H. Osterloh, F. Grimminger // Nat Rev Drug Discov. – 2006. – V.5. №8. – P. 689–702.
72. Goerne H. Imaging of pulmonary hypertension: an update [Text] / H. Goerne, K. Batra, P. Rajiah // Cardiovasc Diagnosis Ther. – 2018. – V.8. №3. –P. 279–296.
73. Gomez-Arroyo J.G. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects [Text] / J. G. Gomez-Arroyo, S. J. Saleem, S. Mizuno [et al.] // Am J Physiol-lung C. – 2012. – V. 302. № 10. – P. L977–L991.
74. Gomez-Arroyo J.G. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective [Text] / J.G. Gomez-Arroyo, L. Farkas, A.A. Alhussaini [et al.] // Am J Physiol-lung C. – 2012. – V.302. №4. – P. L363–L369.
75. Goncharova E.A. Update in pulmonary vascular diseases and right ventricular dysfunction in 2019 [Text] / E. A. Goncharova, S.Y. Chan, C.E. Ventetuolo [et al.] // Am J Resp Crit Care. – 2020. – V.202. № 1. – P. 22–28.
76. Greenberg S. Co-Enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease [Text] / S. Greenberg, W.H. Frishman // J Clin Pharmacol. – 1990. – V.30. №7. – P. 596–608.
77. Groth A. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension [Text] / A. Groth, B. Vrugt, M. Brock // Respir Res. – 2014. – V.15. №1. – P. 47–47.
78. Grunfeld S. Role of Superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats [Text] / S. Grunfeld, C. A. Hamilton, S. Mesaros [et al.] // Hypertension. – 1995. – V.26. №6. – P. 854–857.
79. Gubrij I.B. Reversal of MicroRNA dysregulation in an animal model of pulmonary hypertension [Text] / I.B. Gubrij, A.K. Pangle, L. Pang [et al.] // Plos One. – 2016. – V.11. №1. – P. e0147827.
80. Gutierrez-Mariscal F.M. Coenzyme Q10 supplementation for the reduction of oxidative stress: clinical implications in the treatment of chronic diseases [Text] / F.M. Gutierrez-Mariscal, A.P. Arenas-de Larriva, L. Limia-Perez [et al.] // Int J Mol Sci. – 2020. – V.21. №21. – P. 7870.
81. Ha E.J. Plasma selenium and plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity increase with estrogen during the menstrual cycle [Text] / E.J. Ha, A.M. Smith // J Am Coll Nutr. – 2003. – V.22. №1. – P. 43–51.

82. Hadrup N. Loeschner, K., Skov, K. Effects of 14-day oral low dose selenium nanoparticles and selenite in rat-as determined by metabolite pattern determination [Text] / N. Hadrup, K. Loeschner, K. Skov // PeerJ. – 2016. – V.4. –P. e2601.
83. Hargreaves I. Disorders of human coenzyme q10 metabolism: an overview [Text] / I. Hargreaves R.A. Heaton, D. Mantle // Int J Mol Sci. – 2020. – V.21. №18. – P. 6695.
84. Hayashi S. et al. Establishment of an animal model for pulmonary fibrosis in mice using monocrotaline [Text] / S. Hayashi, K. Mitsumori, K. Imaida [et al.] // Toxicol Pathol. – 1995. – V.23. №1. – P. 63–71.
85. Henrickson K.J. Dilute solution of vancomycin and heparin retains antibacterial and anticoagulant activities [Text] / K.J. Henrickson, K.R. Powell, C.L. Schwartz // J Infect Dis. – 1988. – V. 157. № 3. – P. 600–601.
86. Hernández-Camacho J.D. Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease [Text] / J.D. Hernández-Camacho, M. Bernier, G. López-Lluch [et al.] // Front Physiol. –2018. – V.3. – P.44
87. Hoeper M.M. A global view of pulmonary hypertension [Text] / M.M. Hoeper, M. Humbert, R. Souza [et al.] // Lancet Respir Medicine. – 2016. – V.4. №4. – P. 306–322.
88. Hondal R.J. Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions [Text] / R.J. Hondal, S.M. Marino, V.N. Gladyshev // Antioxid Redox Sign. – 2013. – V.18. №13. – P. 1675–1689.
89. Hoshikawa Y. Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice [Text] / Y. Hoshikawa, P. Nana-Sinkam, M.D. Moore [et al.] // Physiol Genomics. – 2003. – V.12. №3. – P. 209–219.
90. Huang J. Hypoxia-induced pulmonary hypertension and chronic lung disease: caveolin-1 dysfunction an important underlying feature [Text] / J. Huang, M. Frid, M.H. Gewitz [et al.] // Pulm Circ. – 2019. – V.9. №1. – P. 2045894019837876.
91. Huang Z. The Role of Selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [et al.] / Z. Huang, A.H. Rose, P.R. Hoffmann // Antioxid Redox Sign. – 2012. – V.16. №7. – P. 705–743.
92. Humbert M. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension [Text] / M. Humbert, G. Monti, F. Brenot [et al.] // Am J Resp Crit Care. – 1995. – V.151. №5. – P. 1628–1631.
93. Humbert M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives [Text] / M. Humbert, C. Guignabert, S. Bonnet [et al.] // Eur Respir J. – 2019. – V.53. №1. – P. 1801887.
94. Humbert M. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era [Text] / M. Humbert, O. Sitbon, A. Chaouat [et al.] // Circulation. – 2010. – V.122. №2. – P. 156–163.

95. Huo J. Coenzyme Q10 prevents senescence and dysfunction caused by oxidative stress in vascular endothelial cells [Text] / J. Huo, Z. Xu, K. Hosoe [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – V.2018. – P. 3181759.
96. Huynh K. Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice [Text] / K. Huynh, H. Kiriazis, X.J. Du [et al.] // *Free Radical Bio Med.* – 2013. – V.60. – P. 307–317.
97. Ignarro L.J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide [Text] / L. J. Ignarro, G. M. Buga, K.S. Wood [et al.] // *Proc National Acad Sci.* – 1987. – V.84. №24. – P. 9265–9269.
98. Ivanov A.V. Single Intravenous Injection of Coenzyme Q10 Protects the Myocardium after Irreversible Ischemia [Text] //A.V. Ivanov, E.A. Gorodetskaya, E.I. Kalenikova [et al.] // *B Exp Biol Med+*. – 2013. – V. 155. №6. – P. 771–774.
99. Iwasa T. The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and adipose tissue are changed by estrogen treatment in female rats. The effects of chronic testosterone administration on body weight, food intake, and adipose [Text] / T. Iwasa, T. Matsuzaki, K. Yano [et al.] // *Horm Behav.* – 2017. – V.93. – P. 53–61
100. Jouneau S. Analysis of body mass index, weight loss and progression of idiopathic pulmonary fibrosis [Text] / S. Jouneau, B. Crestani, R. Thibault [et al.] // *Respir Res.* – 2020. – V.21. №1. – P. 312.
101. Kalenikova E.I. Chronic administration of coenzyme Q10 limits postinfarct myocardial remodeling in rats [Text] / E.I. Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, E.G. Kolokolchikova [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2007. – V.72. – P.332-338.
102. Katayama K. studies on lymphatic absorption of 1', 2'-(3H)-Coenzyme Q10 in rats [Text] / K. Katayama, T. Fujita // *Chem Pharm Bulletin.* – 1972. –V.20. №12. – P. 2585–2592.
103. Kayo C.Y. In: Cellular aspects of smooth muscle function / C.Y. Kayo, M.E Carsten // Cambridge University Press. – 2005. P. 289.
104. Kikuchi N. Diagnostic and prognostic significance of serum levels of sep (selenoprotein p) in patients with pulmonary hypertension [Text] / N. Kikuchi, K. Satoh, T. Satoh [et al.] // *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology.* – 2019. – V.39. №12. – P. 2553–2562.
105. Kikuchi N. Selenoprotein P promotes the development of pulmonary arterial hypertension [Text] / N. Kikuchi, K. Satoh, R. Kurosawa [et al.] // *Circulation.* – 2018. – V.138. №6. – P. 600–623.
106. Kikuchi, N. Y. Response by Kikuchi et al regarding article, "Selenoprotein p promotes the development of pulmonary arterial hypertension: a possible novel therapeutic target" [Text] / N. Kikuchi, K. Satoh, Y. Saito [et al.] // *Circulation.* – 2019. –V.139. №5. –P. 724–725.

107. Kishimoto Ch. The Protection of Coenzyme Q10 against experimental viral myocarditis in mice: The 8th conference on prevention for rheumatic fever and rheumatic heart disease [Text] / C. Kishimoto, S. Tamaki, A. Matsumori [et al.] // *Jpn Circulation J.* – 1984. – V.48. №12. – P. 1358–1361.
108. Kozaeva L. Beneficial effect of coenzyme Q10 injection on nitric oxide -related dilation of the rat aorta [Text] / L. Kozaeva, E. Gorodetskaya, K. Ruuge Enno [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2017. – V.794. – P. 15–19.
109. Krasuski R.A. Pulmonary Hypertension [Text] / R.A. Krasuski // *Cardiol Clin.* – 2022. – V.40. №1. – P. xi–xii.
110. Kumar A. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome [Text] / A. Kumar, H. Kaur, P. Devi [et al.] // *Pharmacol Therapeut.* – 2009. – V.124. №3. – P. 259–268.
111. Kuropatkina T. Sex-Dependent protective effect of combined application of solubilized ubiquinol and selenium on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in wistar rats [Text] / T. Kuropatkina, O. Pavlova, M. Gulyaev // *Antioxidants (Basel, Switzerland).* – V.11. №3. – P. 549.
112. Kuropatkina T. Ubiquinol ameliorates endothelial dysfunction and increases expression of miRNA-34a in a rat model of pulmonary hypertension [Text] / T. Kuropatkina, V. Pankova, N. Medvedeva [et al.] // *Res Results Pharmacol.* – 2021. – V.7. №3. – P. 23–31.
113. Lahm T. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension [Text] / T. Lahm, R.M. Tuder, I. Petrache // *Am J Physiol-lung C.* – 2014. – V. 307. №1. – P. L7–L26.
114. Lan N.S.H. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment [Text] / NSH. Lan, BD. Massam, SS. Kulkarni, CC. Lang // *Dis.* – 2018. – V. 6ю № 2. – P. 38.
115. Langsjoen P.H. Treatment of hypertrophic cardiomyopathy with coenzyme Q10 [Text] / P.H. Langsjoen, A. Langsjoen, R. Willis [et al.] // *Mol Aspects Med.* – 1997. – V.18. – P. 145–151.
116. Lawrie A. Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease [Text] / A. Lawrie, E. Spiekerkoetter, E. C. Martinez [et al.] // *Circ Res.* – 2005. – V.97. №3. – P. 227–235.
117. Lee A.J., Chiao T.B., Tsang M.P. Sildenafil for pulmonary hypertension [Text] / A.J. Lee, T.B. Chiao, M.P. Tsang [et al.] // *Ann Pharmacother.* – 2005. – V.39. №5. – P. 869–884.
118. Lee Y.S. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung [Text] / Y.S. Lee, J. Byun, J.A. Kim [et al.] // *Exp Mol Medicine.* – 2005. – V.37. №1. – P. 27–35.
119. Li X. Endothelial Dec1-PPAR $\gamma$  axis impairs proliferation and apoptosis homeostasis under hypoxia in pulmonary arterial hypertension [Text] / X. Li, C. Liu, W. Qi [et al.] // *Frontiers Cell Dev Biology.* – 2021. – V.9. – P. 757168.

120. Li Y.B. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells [Text] / Y.B. Li, J.Y. Han, W. Jiang [et al.] // *Mol Biol Rep.* – 2011. – V.38. №4. – P. 2301–2306.
121. Lim J.Y. TGF- $\beta$ 1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation [Text] / J. Y. Lim, S.J. Park, H.Y. Hwang [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2005. – V.39. №4. – P. 627–636.
122. Long L. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension [Text] / L. Long, M.L. Ormiston, X. Yang [et al.] // *Nat Med.* – 2015. – V.21. №7. – P. 777–785.
123. Lu C. Identification and characterization of selenoprotein K: An antioxidant in cardiomyocytes [Text] / C. Lu, F. Qiu, H. Zhou [et al.] // *Febs Lett.* – 2006. – V.580. №22. – P. 5189–5197.
124. MacLean M.R. Membrane Receptors, channels and transporters in pulmonary circulation [Text] / M.R. MacLean, Y. Dempsie // *Adv Exp Med Biol.* – 2009. – V.661. – P. 309–322.
125. Manoukian A.A. Rhabdomyolysis secondary to lovastatin therapy [Text] / A.A. Manoukian, N.V. Bhagavan, T. Hayashi [et al.] // *Clin Chem.* – 1990. – V.36. №12. – P. 2145–2147.
126. Mantle D. Bioavailability of coenzyme q10: an overview of the absorption process and subsequent metabolism [Text] / D. Mantle, A. Dybring // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – V.9. – P.386
127. Mantle D. Coenzyme Q10 and degenerative disorders affecting longevity: an overview [Text] / D. Mantle, I. Hargreaves // *Antioxidants.* – 2019. – V.8. №2. – P. 44.
128. Maroz A. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity [Text] / A. Maroz, RF. Anderson, RA. Smith, MP. Murphy [et al.] // *Free Radical Bio Med.* – 2009. – V. 46, №1. – P. 105–109.
129. Massaro D. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice [Text] / D. Massaro, G.D. Massaro // *Am J Physiol-lung C.* – 2006. – V.290. №5. – P. L866–L870.
130. Meydani M. Modulation of the platelet thromboxane A2 and aortic prostacyclin synthesis by dietary selenium and vitamin E [Text] / M. Meydani // *Biol Trace Elem Res.* – 1992. – V.33. №1–3. – P. 79–86.
131. Mikhael M. Oxidative Stress and Its Implications in the Right Ventricular Remodeling Secondary to Pulmonary Hypertension [Text] / M. Mikhael, C. Makar, A. Wissa [et al.] // *Front Physiol.* – 2019. – V.10. – P. 1233.
132. Miles M.V. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults [Text] / M.V. Miles, P. S. Horn, J. A. Morrison [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2003. – V.332. №1–2. – P. 123–132.



133. Miller L.R. Considering sex as a biological variable in preclinical research [Text] / L.R. Miller, C. Marks, J.B. Becker [et al.] // *Faseb J.* – 2017. – V.31. №1. – P. 29–34.
134. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c 1 complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle [Text] / P. Mitchell // *Febs Lett.* – 1975. – V.56. №1. – P. 1–6.
135. Moghaddam A.K.Z. Role of selenium from different sources in prevention of pulmonary arterial hypertension syndrome in broiler chickens [Text] / A.K.Z. Moghaddam, M.H. Mehraei Hamzekolaei, F. Khajali [et al.] // *Biol Trace Elem Res.* – 2017. – V. 180. №1. –P. 164–170.
136. Mohamed D.I. et al. Coenzyme Q10 attenuates lung and liver fibrosis via modulation of autophagy in methotrexate treated rat [Text] / D.I. Mohamed, E. Khairy, S.S. Tawfek [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – V.109. – P. 892–901.
137. Mohamed H.A. Coenzyme Q10 attenuates inflammation and fibrosis implicated in radiation enteropathy through suppression of NF-kB/TGF- $\beta$ /MMP-9 pathways [Text] / H.A. Mohamed, R.S. Said // *Int Immunopharmacol.* – 2021. – V.92. – P. 107347.
138. Mohammadi A.B. Therapeutic implication of coenzyme Q10 during statin therapy: pros and cons [Text] / A.B. Mohammadi, M.J. Hosseini // *Trends in Pharmaceutical Sciences.* – 2015. №1. – P. 119–128.
139. Mohseni M. Effects of coenzyme q10 supplementation on serum lipoproteins, plasma fibrinogen, and blood pressure in patients with hyperlipidemia and myocardial infarction [Text] / M. Mohseni, M.R. Vafa, S.J. Hajimiresmail [et al.] // *Iran Red Crescent Me.* – 2014. – V.16.
140. Molinari C. Cooperative Effects of Q10, Vitamin D3, and L-Arginine on Cardiac and Endothelial Cells [Text] / C. Molinari, V. Morsanuto, S. Polli [et al.] // *J Vasc Res.* – 2018. – V.55. №1. – P. 47–60.
141. Molyneux S.L. Coenzyme Q10 an independent predictor of mortality in chronic heart failure [Text] / S.L. Molyneux, C.M. Florkowski, P.M. George [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2008. – V.52. №18. – P. 1435–1441.
142. Morecroft I. Functional Interactions between 5-Hydroxytryptamine Receptors and the Serotonin Transporter in Pulmonary Arteries [Text] / I. Morecroft, L. Loughlin, M. Nilsen [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2005. – V.313. №2. – P. 539–548.
143. Mozaffarian D. Heart disease and stroke statistics—2015 update [Text] / D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go [et al.] // *Circulation.* – 2015. – V.131. №4. – P. e29–e322.
144. Neas L.M., Schwartz J. The determinants of pulmonary diffusing capacity in a national sample of U.S. adults [Text] / L.M. Neas, J. Schwartz // *Am J Resp Crit Care.* – 1996. – V.153. №2. – P. 656–664.

145. Obolenskaia O. Intravenous administration of coenzyme q10 in acute period of cerebral ischemia decreases mortality by reducing brain necrosis and limiting its increase within 4 days in rat stroke model [Text] / O. Obolenskaya, E. Gorodetskaya, E. Kalennikova [et al.] // *Antioxidants*. 2020. – V.9. №12. – P. 1240.
146. Olama N.K. The potential protective role of coenzyme q10 on the cyclophosphamide-induced lung toxicity in adult male albino rats: a histological and ultrastructural study [Text] / N.K. Olama, M. Taha, H.Y. Rady // *Int J Sci Reports*. – 2018. – V.4. №9. – P. 225–234.
147. Oliveira-Silva J.A. Oxidative stress assessment by glutathione peroxidase activity and glutathione levels in response to selenium supplementation in patients with Mucopolysaccharidosis I, II and VI [Text] / JA. Oliveira-Silva, JUP. Yamamoto, R.B. Oliveira [et al.] // *Genet Mol Biol*. – 2019. – V. 42. №1. – P. 1–8.
148. Olivieri F. Anti-inflammatory effect of ubiquinol-10 on young and senescent endothelial cells via miR-146a modulation [Text] / F. Olivieri, R. Lazzarini, L. Babini [et al.] // *Free Radical Bio Med*. – 2013. – V.63. – P. 410–420.
149. Pérez-López F.R. Cardiovascular risk in menopausal women and prevalent related co-morbid conditions: facing the post-Women’s Health Initiative era [Text] / F.R. Pérez-López, P. Chedraui, J.J. Gilbert [et al.] // *Fertil Steril*. – 2009. – V.92. №4. – P. 1171–1186.
150. Pinto R.E., Bartley W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates [Text] / R.E. Pinto, W. Bartley // *Biochem J*. – 1969. – V.112. №1. – P. 109–115.
151. Pravst I. Comparative bioavailability of different coenzyme q10 formulations in healthy elderly individuals [Text] / I. Pravst, J.C. Rodríguez Aguilera, A.B. Cortes Rodriguez [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – V.12. №3. – P. 784.
152. Rabanal-Ruiz Y. The use of coenzyme q10 in cardiovascular diseases [Text] / Y. Rabanal-Ruiz E. Llanos-González, F.J. Alcain // *Antioxidants*. – 2021. – V.10. №5. – P. 755.
153. Raines A. M. Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents / A.M. Raines, R.A. Sunde // *BMC genomics*. – 2011. – V.12. – P.26.
154. Rakuša Ž.T. Stability of reduced and oxidized coenzyme q10 in finished products [Text] / Ž.T. Rakuša, A. Kristl, R. Rožkar // *Antioxidants*. – 2021. – V.10. №3. – P. 360.
155. Reid G.M. Sudden infant death syndrome: Selenium administered above dietary needs stabilizes the electrocardiograms of subjects deprived of exercise stimuli to the brain [Text] / G.M. Reid // *Med Hypotheses*. – 2007. – V.68. №6. – P. 1265–1267.
156. Rock C. Selenoprotein P protects cells from lipid hydroperoxides generated by 15-LOX-1 [Text] / C. Rock, P.J. Moos // *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids Plefa*. – 2010. – V.83. № 4–6. – P. 203–210.

157. Ruan Y. Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low- and middle-income countries: results from SAGE Wave 1 [Text] / Y. Ruan, Y. Guo, Y. Zheng [et al.] // *Bmc Public Health*. – 2018. – V.18. №1. – P. 778.
158. Rubin L.J. Prostacyclin-induced acute pulmonary vasodilation in primary pulmonary hypertension [Text] / L.J. Rubin, B.M. Groves, J.T. Reeves [et al.] // *Circulation*. – 2018. – V.66. №2. – P. 334–338.
159. Sabbatinelli J. Ubiquinol ameliorates endothelial dysfunction in subjects with mild-to-moderate dyslipidemia: a randomized clinical trial [Text] / J. Sabbatinelli, P. Orlando, R. Galeazzi [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – V.12. №4. – P. 1098.
160. Savoia C. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension [Text] / C. Savoia, L. Sada, L. Zezza [et al.] // *Int J Hypertens*. – 2011. – P. 281240.
161. Schermuly R.T. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension [Text] / R.T. Schermuly, H.A. Ghofrani, M.R. Wilkins [et al.] // *Nat Rev Cardiol*. – 2011. – V.8. №8. – P. 443–455.
162. Schmelzer C. Effects of coenzyme Q10 on TNF- $\alpha$  secretion in human and murine monocytic cell lines [Text] / C. Schmelzer, G. Lorenz, I. Lindner [et al.] // *Biofactors*. – 2007. – V.31, №1. – P. 35–41.
163. Schmelzer C. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression [Text] / C. Schmelzer, I. Lindner, G. Rimbach [et al.] // *Biofactors*. – 2008. – V.32. №1-4. – P. 179-183.
164. Schmelzer C. In Vitro effects of the reduced form of coenzyme Q10 on secretion levels of TNF- $\alpha$  and chemokines in response to lps in the human monocytic cell line thp-1 [Text] / C. Schmelzer, G. Lorenz, G. Rimbach [et al.] // *J Clin Biochem Nutr*. – 2009. – V.44. №1. – P. 62–66.
165. Schmelzer C. Influence of Coenzyme Q10 on release of pro-inflammatory chemokines in the human monocytic cell line THP-1 [Text] / C. Schmelzer, G. Lorenz, G. Rimbach // *Biofactors*. – 2007. – V. 31. №3-4. – P. 211–217.
166. Schomburg L. Selenoprotein-P deficiency predicts cardiovascular disease and death [Text] / L. Schomburg, M. Orho-Melander, J. Struck [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – V.11. №8. – P. 1852.
167. Schwarz K. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration [Text] / K. Schwarz, C.M. Foltz // *Nutrition Burbank Los Angeles Cty Calif*. – 1951. – V.15. №3. – P. 255.
168. Seale L.A. Selenocysteine  $\beta$ -Lyase: biochemistry, regulation and physiological role of the selenocysteine decomposition enzyme [Text] / L.A. Seale // *Antioxidants*. 2019. – V. 8. №9. – P. 357.
169. Serebruany V. Dietary coenzyme Q10 supplementation alters platelet size and inhibits human vitronectin (CD51/CD61) receptor expression [Text] / V.L. Serebruany, J.V. Ordonez, W. R. Herzog [et al.] // *J Cardiovasc Pharm*. – 1997. – V.29. №1. – P. 16–22.

170. Serebruany V.L. Could coenzyme Q10 affect hemostasis by inhibiting platelet vitronectin (CD51/CD61) receptor? [Text] / V.L. Serebruany, P.A. Gurbel, J.V. Ordoñez [et al.] // *Mol Aspects Med.* – 1997. – V.18. – P. 189–194.
171. Sharp J. Coenzyme Q supplementation in pulmonary arterial hypertension [Text] / J. Sharp, S. Farha, M.M. Park, S.A. Comhair [et al.] // *Redox Biol.* – 2014. – V.2. – P. 884–891.
172. Shekelle P. Effect of supplemental antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cardiovascular disease [Text] / P. Shekelle, S. Morton, M.L. Hardy // *Evid Rep Technology Assess Summ.* – 2003. №83. – P. 1–3.
173. Shortness of Breath (Dyspnea) in Pulmonary Fibrosis [Электронный ресурс]: official web-site. – URL: <https://pulmonaryfibrosisnews.com/shortness-of-breath-dyspnea>.
174. Shults N.V. Redox biology of right-sided heart failure [Text] / N.V. Shults, O. Melnyk, D.I. Suzuki [et al.] // *Antioxidants.* – 2018. – V.7. №8. – P. 106.
175. Singh U. Coenzyme Q10 supplementation and heart failure [Text] / U. Singh, S. Devaraj, I. Jialal // *Nutr Rev.* – 2007. – V.65. №6. – P. 286–293.
176. Sitbon O. Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension [Text] / O. Sitbon, M. Humbert, J. Jagot [et al.] // *Eur Respir J.* – 1998. – V.12. №2. – P. 265–270.
177. Sitbon O. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension [Text] / O. Sitbon, M. Humbert, X. Jaïs // *Circulation.* – 2005. – V.111. №23. – P. 3105–3111.
178. Skarlovnik A. Coenzyme Q10 supplementation decreases statin-related mild-to-moderate muscle symptoms: a randomized clinical study [Text] / A. Skarlovnik, M. Janić, M. Lunder [et al.] // *Medical Sci Monit Int Medical J Exp Clin Res.* – 2014. – V.20. – P. 2183–2188.
179. Steiner M.K. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension [Text] / M.K. Steiner, O.L. Syrkina, N. Kolliputi [et al.] // *Circ Res.* – 2009. – V.104. №2. – P. 236–244.
180. Stenmark K.R. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure [Text] / K.R. Stenmark, B. Meyrick, N. Galie [et al.] // *Am J Physiol-lung C.* – 2009. – V.297. №6. – P. L1013–L1032.
181. Stenmark K.R. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling [Text] / K.R. Stenmark, K.A. Fagan, M.G. Frid // *Circ Res.* – 2006. – V.99. №7. – P. 675–691.
182. Stoedter M. Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice [Text] / M. Stoedter, K. Renko, A. Hög [et al.] // *Biochem J.* – 2010. – V. 429. №1. – P. 43–51.

183. Tahamtan A. Anti-Inflammatory microRNAs and their potential for inflammatory diseases treatment [Text] / A. Tahamtan, M. Teymoori-Rad, B. Nakstad [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – V.9. – P. 1377.
184. Thenappan T. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management [Text] / T. Thenappan, M.L. Ormiston, J.J. Ryan [et al.] // *Bmj.* – 2018. – V.360. – P. j5492.
185. Tiano L. Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study [Text] / L. Tiano, R. Belardinelli, P. Carnevali [et al.] // *Eur Heart J.* – 2007. – V.28. №18. – P. 2249–2255.
186. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health [Text] / U. Tinggi // *Environmental Health and Prevent. Med.* – 2008. №13. – P. 102–108.
187. Traber M.G. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins [Text] / M.G. Traber, J.C. Lane, N.R. Lagmay [et al.] // *Lipids.* – 1992. – V.27. №9. – P. 657–663.
188. Tsai K.L. A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways [Text] / K.L. Tsai, Y.H. Huang, C.L. Kao [et al.] // *J Nutritional Biochem.* – 2012. – V.23. №5. – P. 458–468.
189. Urbankova L. Effects of sub-lethal doses of selenium nanoparticles on the health status of rats [Text] / L. Urbankova, S. Skalickova, M. Pribilova // *Toxics.* 2021. – V.9. №2. – P.28.
190. Urboniene D. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension [Text] / D. Urboniene, I. Haber, Y.H. Fang [et al.] // *Am J Physiol-lung C.* – 2010. – V.299. №3. – P. L401–L412.
191. Vadhanavikit S. Selenium deficiency and decreased Coenzyme Q levels [Text] / S. Vadhanavikit, H.E. Ganther // *Mol Aspects Med.* – 1994. – V.15. – P. s103–s107.
192. Vaziri N.D. Rodríguez-Iturbe B. mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension [Text] / N.D. Vaziri, B. Rodríguez-Iturbe // *Nat Clin Pract Neph.* – 2006. – V.2. №10. – P. 582–593.
193. Villalba J. Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations [Text] / J. M. Villalba, C. Parrado, M. Santos-Gonzalez [et al.] // *Expert Opinion on Investigational Drugs.* – 2010. – V.4. №19. – P. 535–554.
194. Viña J. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds [Text] / J. Viña, C. Borrás, J. Gambini [et al.] // *Febs Lett.* – 2005. – V.579. №12. – P. 2541–2545.
195. Wang Q. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF- $\alpha$  antagonists via the suppression of TNF- $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B pathway in rats [Text] / Q. Wang, X.R. Zuo, Y.Y. Wang [et al.] // *Vasc Pharmacol.* – 2013. – V.58. №1–2. – P. 71–77.

196. Wang X. Oxidative profiling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension [Text] / X. Wang, N.V. Shults, Y.J. Suzuki [et al.] // Plos One. – 2017. – V.12. №5. – P. e0176887.
197. Wharton J. Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells [Text] / J. Wharton, J. W. Strange, G. M. Møller [et al.] // Am J Resp Crit Care. – 2005. – V.172. №1. – P. 105–113.
198. Wilcox S.R. Pulmonary hypertension and right ventricular failure in emergency medicine / SR. Wilcox, C. Kabrhel, RN. Channick // Ann Emerg Med. – 2015. – V.66. № 6. – P. 619–628.
199. Wilkins M.R. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum [Text] / M.R. Wilkins // European Respir Rev. – 2012. – V.21. №123. – P. 19–26.
200. Wu Y.R. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer [Text] / Y.R. Wu, H.J. Qi, D.F. Deng [et al.] // Tumor Biol. – 2016. – V.37. №9. – P. 12061–12070.
201. Xiao R. Monocrotaline pyrrole induces pulmonary endothelial damage through binding to and release from erythrocytes in lung during venous blood reoxygenation [Text] / R. Xiao, L. Zhu, Y. Su [et al.] // Am J Physiol-lung C. – 2019. – V.316. №5. – P. L798–L809.
202. Xu D. Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function of extracellular superoxide dismutase [Text] / D. Xu, H. Guo, X. Xu [et al.] // Hypertension. – 2011. – V.58. №2. – P. 303–309.
203. Yaghi S. Clinical update on pulmonary hypertension [Text] / S. Yaghi, A. Novikov, T. Trandafirescu // J Invest Med. – 2020. – V.68. №4. – P. 821.
204. Yang J. Betaine Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats via Inhibiting Inflammatory Response [Text] / J.M. Yang, R. Zhou, M. Zhang [et al.] // Mol J Synthetic Chem Nat Prod Chem. – 2018. – V.23. №6. – P. 1274.
205. Yang R. Selenium and selenoproteins, from structure, function to food resource and nutrition [Text] / R. Yang, Y. Liu, Z. Zhou // Food Sci Technol Res. – 2017. – V.23. №3. – P. 363–373.
206. Yang Y.K. Coenzyme Q10 treatment of cardiovascular disorders of ageing including heart failure, hypertension and endothelial dysfunction [Text] / Y.K. Yang, L.P. Wang, L. Chen [et al.] // Clin Chim Acta. – 2015. – V.450. – P. 83–89.
207. Yoshida T. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury [Text] / T. Yoshida, N. Maulik, R.M. Engelman [et al.] // Circulation. – 1997. – V. 96. №9 – P. II-216–220.
208. Zhai J. Effects of Coenzyme Q10 on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis [Text] / J. Zhai, Y. Bo, Y. Lu [et al.] // Plos One. – 2017. – V.12. №1. – P. e0170172.

209. Zhang Y. Restricted uptake of dietary coenzyme Q Is in contrast to the unrestricted uptake of  $\alpha$ -tocopherol into rat organs and cells [Text] / Y. Zhang, M. Turunen, E.L. Appelkvist // J Nutrition. – 1996. – V.126. № 9. – P. 2089–2097.
210. Zhang Y. Ubiquinol is superior to ubiquinone to enhance Coenzyme Q10 status in older men [Text] / Y. Zhang, J. Liu, XQ. Chen, CY. Oliver Chen // Food Funct. – 2018. – V. 9. №11. – P.5653–5659.
211. Zhou G. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension [Text] / G. Zhou, T. Chen, J.U. Raj // Am J Resp Cell Mol. – 2015. – V.52. №2. – P. 139–151.
212. Zhou X. Estrogen status alters tissue distribution and metabolism of selenium in female rats [Text] / X. Zhou, A.M. Smith, M.L. Failla [et al.] // J Nutritional Biochem. – 2012. – V.23. №6. – P. 532–538.
213. Zhou Y. Decreased adiponectin and increased inflammation expression in epicardial adipose tissue in coronary artery disease [Text] / Y. Zhou, Y. Wei, L. Wang // Cardiovasc Diabetol. – 2011. – V.10. №1. – P. 2.
214. Zhu M. Amorphous selenium nanoparticles improve vascular function in rats with chronic isocarbophos poisoning via inhibiting the apoptosis of vascular endothelial cells [Text] / M. Zhu, Z. Gao, Y. Fu [et al.] // Frontiers Bioeng Biotechnology. – 2021. – V.9. – P. 673327.
215. Zozina V.I. Coenzyme Q10 in cardiovascular and metabolic diseases: current state of the problem [Text] / V.I. Zozina, S. Covantev, O.A. Goroshko [et al.] // Curr Cardiol Rev. – 2018. – V.14. №3. – P. 164–174.