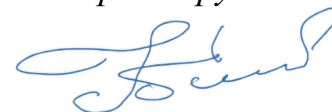


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи



Оболенская Ольга Николаевна

**Нейропротекторная эффективность внутривенной формы убихинола на
модели фокальной ишемии головного мозга**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Каленикова Елена Игоревна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ И ПОДХОДАХ К ЛЕЧЕНИЮ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА, БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ПОТЕНЦИАЛЕ УБИХИНОЛА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1. Ишемический инсульт.....	16
1.2. Препараты, рекомендуемые для нейропротекции при ишемическом инсульте.....	19
1.3. Коэнзим Q10: структура, биологические функции и терапевтический потенциал.....	24
1.4. Фармакологическая эффективность убихинола в эксперименте и клинической практике.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Изучаемые препараты.....	38
2.2. Животные для проведения эксперимента.....	39
2.3. Общая анестезия.....	40
2.4. Внутривенное введение препаратов.....	40
2.5. Оценка неврологического дефицита по протоколу mNSS.....	41
2.6. Эвтаназия.....	43
2.7. Аналитические методы исследования.....	43
2.7.1. Подготовка биоматериала к анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	43
2.7.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	45
2.8. Экспериментальная модель острой фокальной ишемии головного мозга крысы – временная интралюминальная окклюзия филаментом средней мозговой артерии.....	47
2.9. Оценка зоны повреждения головного мозга крыс после проведения фокальной ишемии головного мозга (моделирование инсульта).....	49

2.9.1. Оценка зоны повреждения при помощи окрашивания метаболическим красителем	49
2.9.2. Оценка зоны повреждения головного мозга у крысы методом магнитно-резонансной томографии на 1 и 4 сутки.....	50
2.10. Протоколы исследований	51
2.11. Статистические методы анализа полученных результатов	54
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ УБИХИНОЛА И УБИХИНОНА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ, ИМЕЮЩИХ ОДИНАКОВЫЙ СОСТАВ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ	55
3.1. Обоснование временных интервалов и дозировок исследуемых препаратов.....	55
3.2. Уровни CoQ10 в плазме.....	56
3.3. Тканевое распределение коэнзима Q10	57
3.4. Оценка тканевой биодоступности убихинола и убихинона, введенных внутривенно	61
3.5. Характеристики тканевого распределения коэнзима Q10 после внутривенного введения крысам убихинола и убихинона	62
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ УБИХИНОЛА И УБИХИНОНА ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ В ОСТРОЙ СТАДИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПО КРИТЕРИЯМ ВЫЖИВАЕМОСТИ, НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА, РАЗМЕРА ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ КОЭНЗИМА Q10 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ОТ НАЧАЛА ИШЕМИИ.....	65
4.1. Выживаемость	65
4.2. Неврологический статус.....	66
4.3. Размер зоны ишемического повреждения после окклюзии средней мозговой артерии через 24ч	67

4.4. Содержание коэнзима Q10 в головном мозге крыс после окклюзии средней мозговой артерии через 24 часа	68
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УБИХИНОЛА, ВВЕДЕННОГО ВНУТРИВЕННО В ОСТРОЙ СТАДИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ, РАЗМЕР И ДИНАМИКУ ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ ОТ 1-Х ДО 4-Х СУТОК МЕТОДОМ МРТ, НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЖИВОТНЫХ И ВЫРАЖЕННОСТЬ ДЕФИЦИТА КОЭНЗИМА Q10 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕРЕЗ 4 СУТОК.....	81
5.1. Выживаемость	81
5.2. Неврологический статус	81
5.3. Размер инфаркта головного мозга на 1 и 4 сутки после окклюзии средней мозговой артерии.....	82
5.4. Концентрация коэнзима Q10 в головном мозге у крысы на 4 сутки после окклюзии средней мозговой артерии в исследовании магнитно-резонансной томографии	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЕ А	119
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ В	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По последним данным мировой статистики неврологических заболеваний Global Burden Diseases (GBD), в 2019 году среди всех неврологических расстройств, включая такие заболевания как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, мигренозные состояния, инсульт является самой распространённой причиной смерти и инвалидизации в мире. В период с 1990 по 2019 год число случаев инсульта по всему миру увеличилось на 70%, также выросла смертность от этого заболевания на 43%. На сегодняшний день мире регистрируют 12,2 млн случаев в год и 6, 55 млн смертей от инсульта. Во всем мире инсульт является второй по значимости причиной смерти. Другим неутешительным фактом является то, что инсульт все чаще стали диагностировать у людей моложе 70 лет, т.е. с каждым годом все больше и больше затрагивается трудоспособное население, что является тяжелой медико-социальной и экономической проблемой по всему миру. По данным ведущих статистических исследований прогнозируется увеличение количества больных с инсультом, и к 2050 году может быть диагностировано 25 миллионов новых случаев инсульта во всем мире, и почти 13 миллионов человек будут погибать ежегодно. Без срочного внедрения эффективных стратегий первичной профилактики и эффективного лечения бремя инсульта, вероятно, будет продолжать расти во всем мире [71].

По данным федеральной службы государственной статистики в 2020 году в Российской Федерации ситуация за последние годы практически не изменилась, сейчас регистрируют 123 случая на 100 тыс. населения. Только у 11-13% больных, перенесших инсульт, наблюдается полное восстановление неврологической симптоматики [21]. Инсульт – преобладающая причина инвалидизации населения. По данным Национального регистра инсульта 31% пациентов, перенесших инсульт, нуждаются в посторонней помощи для ухода за собой, 20% не могут самостоятельно ходить. Лишь 8% выживших пациентов могут вернуться к прежней

работе [13]. Ишемический инсульт встречается в 85% случаев всех форм инсульта. Наиболее вероятным исходом ишемического инсульта, кроме летального, является инвалидизация, достигающая в настоящий момент 80% [19].

Таким образом, изучение возможности снижения тяжести ишемического инсульта и вероятности развития осложнений на сегодняшний день остается актуальной задачей.

Данные международных исследований по лечению ишемического инсульта демонстрируют неослабевающий интерес к изучению антиоксидантов в качестве нейропротекторов. Нейропротекторные свойства антиоксидантов базируются на их способности прерывать каскад реакций перекисного окисления, и в результате тормозить развитие патологического процесса, ограничивая зону некроза и предотвращая дальнейший апоптоз клеток [7]. В то же время, в ряде стран сложилось противоречивое отношение к применению нейропротекторных препаратов для лечения ишемии и инсультов. Так, в европейских странах в протоколах назначения при лечении ишемического инсульта нейропротекторные препараты отсутствуют, в том числе из группы антиоксидантов. В России же, напротив, исторически закрепилось применение нейропротекторов для профилактики и лечения ишемических состояний и инсультов [22, 112].

Коэнзим Q10 – антиоксидант, доказавший в эксперименте свою эффективность в лечении инфаркта и инсульта, является одним из наиболее перспективных веществ для патогенетической терапии ишемических состояний. Это единственный эндогенный жирорастворимый антиоксидант, который образуется во всех тканях млекопитающих, в том числе у человека. Коэнзим Q10 в организме существует в 2-х формах. Убихинон – окисленная форма, синтезируется на внутренней мембране митохондрий и является важным компонентом дыхательной цепи митохондрий. Убихинон принимает протоны во время окислительного фосфорилирования и восстанавливается до убихинола. Убихинол – восстановленная форма коэнзима Q10 содержит в своей структуре два дополнительных атома водорода, которые легко отдает, нейтрализуя свободные радикалы и, таким образом, проявляя свои антиоксидантные свойства [42].

Окисленная форма коэнзима Q10, убихинон, давно применяется при различных патологиях по всему миру [74, 103]. Набрана достаточно обширная база по изучению и доказательству положительных эффектов коэнзима Q10 при лечении различных заболеваний в том числе, нейродегенеративных – болезнь Альцгеймера [52, 109], болезнь Паркинсона [76, 105], боковой амиотрофической склероз [78] и других патологических процессах [108], включая ишемический инсульт, где ключевым фактором развития является оксидативный стресс, вызываемый дисбалансом между окислительными процессами при данных патологиях и естественной антиоксидантной защитой [123]. Интерес врачей и ученых к этому соединению продолжает расти, как и возможности его терапевтического применения [53, 91, 159]. При этом биодоступность препарата при пероральном введении, по некоторым данным, составляет всего 2% [81, 152].

Убихинон оказывает противовоспалительный эффект, влияя на экспрессию нескольких сотен компетентных генов. В исследовании Ghasemloo E. с соавторами в 2021 году на модели ишемического инсульта показано, что внутривенное введение коэнзима Q10 крысам после церебральной ишемии повышает содержание MicroRNA-149-5p, снижает уровень матриксных металлопротеаз и ряда провоспалительных цитокинов, что ведет к ограничению зоны некроза, степени отека мозга и улучшению неврологического статуса [140]. Основываясь на данных предшествующих работ и собственных результатах, авторы исследования полагают, что повышение экспрессии MicroRNA под действием коэнзима Q10, в свою очередь, снижает экспрессию противовоспалительных цитокинов.

Нейропротекторный эффект убихинона проявляется за счет антиоксидантных свойств после его превращения в организме в убихинол. Многие исследователи, изучая результаты терапевтического применения убихинона в качестве антиоксиданта, на самом деле оценивают эффекты убихинола [53].

Исследований по изучению самого убихинола как антиоксиданта, применяемого в терапевтических целях при различных заболеваниях, недостаточно. Одной из основных причин может быть недоверие к стабильности субстанции убихинола.

Механизм действия убихинола связан с его способностью выступать в качестве донора ионов водорода, нейтрализующих избыточное образование свободных радикалов, что приводит к снижению оксидативного стресса и ограничению повреждения органов. По этой причине убихинол актуален для лечения ишемических состояний.

Однако после однократного перорального приема общий уровень коэнзима Q10 в плазме крови увеличивается не быстро и максимальные его уровни регистрируются только спустя 6 часов (по некоторым данным до 8 часов), при этом, его поступление в необходимые органы, в том числе головной мозг, защищенный гематоэнцефалическим барьером, чрезвычайно мало [1,44].

Ишемический инсульт — это тяжелое состояние, которое требует немедленного поступления убихинола в головной мозг, в качестве нейропротектора. Только внутривенное введение, новой солюбилизированной формы убихинола позволяет рассчитывать на достижение необходимого уровня нейропротекторной защиты головного мозга при инсульте (патент RU2635993-C1, Приложение А).

Имеются данные об эффективности окисленной формы коэнзима Q10 (убихинон) при внутривенном введении на фоне острой экспериментальной ишемии органов [16, 24]. При ишемическом инсульте показано, что препарат после внутривенного введения быстро поступает в мозг и оказывает мощное нейропротекторное действие [81]. При этом исследований по введению убихинола (восстановленной формы коэнзима Q10) для лечения ишемического инсульта до начала данного исследования не проводилось.

Степень разработанности темы

На протяжении последних лет, как у отечественных, так и у международных исследователей заинтересованность в изучении нейропротекторного потенциала убихинона значительно выросла. Новые научные работы доказывают его эффективность не только на изолированных клеточных моделях [3], но и на различных экспериментальных моделях инфаркта миокарда, ишемии головного

мозга и нейродегенеративных заболеваний у животных [16,24,81], и применения его в клинической практике у людей [52,54,86,115].

Ранее Белоусовой М., в составе научного коллектива было проведено исследование эффективности окисленной формы коэнзима Q10 (в составе препарата «Кудесан» для внутреннего применения) введенной через вену на модели фокальной ишемии/реперфузии головного мозга. Авторы обнаружили, что убихинон введенный однократно через 45 минут после начала ишемии в дозе 30 мг/кг приводит к его повышению в головном мозге у крыс уже через 15мин и сохранению его повышенных концентраций на протяжении как минимум суток. Убихинон предотвращал разрастание зоны некроза и улучшал неврологические функции у животных в эксперименте [1,81].

Нейропротекторные свойства новой 1% солюбилизированной формы убихинола (восстановленной формы коэнзима Q10) для внутривенного введения прежде не изучалась, не сегодняшний день на фармацевтическом рынке во всем мире отсутствуют лекарственные формы для парентерального введения как с коэнзимом Q10, так и с убихинолом. Как упоминалось ранее, экстренные клинические ситуации, такие как инсульт, нуждаются в быстрой доставке лекарственных веществ в головной мозг, такое возможно только при парентеральном введении препаратов [1,68].

Цели и задачи

Оценка нейропротекторных свойств убихинола в эксперименте при внутривенном введении в острой стадии ишемического инсульта.

1. Изучение и сравнительная оценка фармакокинетики и тканевого распределения убихинола и убихинона в составе новых лекарственных форм для внутривенного введения, имеющих одинаковый состав вспомогательных веществ.
2. Изучение и сравнительная оценка нейропротекторной эффективности убихинола и убихинона при внутривенном введении в острой стадии

ишемического инсульта по критериям выживаемости, размера очага повреждения, неврологического статуса и дефицита коэнзима Q10 в головном мозге через 24 часа от начала ишемии.

3. Изучение влияния убихинола, введенного внутривенно в острой стадии ишемического инсульта, на выживаемость, размер и динамику очага повреждения методом магнитно-резонансной томографии в интервале от 1-х до 4-х суток после создания модели, неврологический статус животных и выраженность дефицита коэнзима Q10 в головном мозге через 4 суток от начала ишемии.

Научная новизна

1. Впервые изучена фармакокинетика и тканевое распределение убихинола на протяжении 8 суток после внутривенного введения.
2. Впервые показана способность убихинола, введенного внутривенно в дозе 30 мг/кг, ограничивать зону некроза головного мозга в течение первых суток экспериментального инсульта.
3. Впервые показано увеличение выживаемости крыс с фокальной ишемией головного мозга через 1 и 4 суток в результате однократного внутривенного введения убихинола в дозе 30 мг/кг.
4. Впервые показана способность убихинола, введенного внутривенно в дозе 30 мг/кг, сохранять на более высоком уровне неврологический статус крыс на 1-е и 4-е сутки экспериментального ишемического инсульта.
5. Впервые при помощи метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) показана способность убихинола при внутривенном введении препятствовать увеличению зоны ишемического повреждения головного мозга крыс с 1-х до 4-х суток фокальной ишемии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные экспериментальные данные об эффективности убихинола при ишемии головного мозга расширяют теоретические знания об этой субстанции и подтверждают необходимость последующего анализа эффективности убихинола введённого через вену на доклиническом этапе.

Выявлена нейропротекторная эффективность убихинола при экспериментальном инсульте, проявляющаяся на 1-е сутки ограничением зоны некроза и большей сохранностью неврологического статуса. В первые 4 суток инсульта убихинол, введенный внутривенно, останавливает прирост поврежденной области, способствуя сохранению неврологического статуса.

Установлена безопасность и эффективность внутривенного введения убихинола в солюбилизированной форме, которое обеспечивает быструю доставку препарата в ткани мозга в urgentных ситуациях.

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения эффективности лекарственной формы убихинола для внутривенного введения в практике лечения ишемических состояний с целью расширения показаний к клиническому применению препаратов убихинола при его внутривенном введении.

Результаты данного эксперимента используются в учебный процесс кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты фармакокинетического исследования, использованы в отчете по государственному контракту от 20 августа 2014 года № 14411.2049999.19.068 «Доклинические исследования инновационного кардиопротекторного лекарственного препарата на основе коэнзима Q10 для внутривенного введения с целью коррекции острых ишемических состояний миокарда» с Минпромторгом России в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Оценка нейропротекторной эффективности убихинола при внутривенном введении

проведена при поддержке гранта РФФИ №14-15-00126 «Изучение потенциала и механизмов нейро- и кардиопротективного действия коэнзима Q10 в острых ишемических состояниях» (продолжение, 2017-2018 г.г.).

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили работы зарубежных и российских ученых в области фармакологии, клинической фармакологии и физиологии. Статистическую обработку результатов и оценку взаимосвязей между результатами биофармацевтического анализа и морфометрического исследования оценивали математическими методами: корреляционный анализ, непараметрический U- критерий Манна-Уитни, для сравнения средних значений с учетом стандартных отклонений использовали метод Стьюдента. В диссертационной работе использованы следующие методы: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), морфометрический метод и МРТ-сканирование. Основные заключения и выводы сделаны на основании результатов собственных исследований с учетом полученных из литературных источников теоретических данных.

Личный вклад

В период подготовки и написания диссертации автором проведен поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Автором были выполнены все этапы экспериментального исследования, получены, обработаны и проанализированы данные экспериментов. Исследование образцов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), анализ хроматограмм, статистический анализ, корреляции и сопоставления результатов после введения препаратов животным проведены лично автором работы. Анализ данных по результатам морфометрии и МРТ-визуализации проведен лично при помощи компьютерной программы ImageJ.

На основе данных, полученных в ходе исследования, автором были подготовлены публикации в отечественных и международных журналах, сформулированы основные положения и выводы по результатам диссертационного исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты сравнительных фармакокинетических исследований убихинола и убихинона в новых лекарственных формах для внутривенного введения.
2. Доказательства нейропротекторной эффективности убихинола при внутривенном введении в острой стадии ишемического инсульта, оцененные на первые сутки инсульта по критериям выживаемости, размера очага повреждения, неврологического статуса и дефицита коэнзима Q10 в головном мозге.
3. Морфометрические и МРТ-доказательства способности убихинола при парентеральном введении в дозе 30 мг/кг на фоне острой очаговой ишемии головного мозга крысы предотвращать увеличение постинсультной зоны повреждения между первыми и 4-ми сутками инсульта.
4. Доказательства нейропротекторной эффективности убихинола при внутривенном введении в острой стадии ишемического инсульта, оцененные на 4-е сутки инсульта по критериям выживаемости, размера очага повреждения, неврологического статуса животных и выраженности дефицита Коэнзим Q10 в головном мозге.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Выполненное исследование по цели и результатам соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология; пункт 5 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток»;

пункт 6 «Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека».

Степень достоверности и апробация результатов

Все исследования проводились после одобрения биоэтическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова и в соответствии с Руководством по работе и уходу за лабораторными животными, ГОСТ 33215–2014. В исследовании использовано 195 самцов крыс линии Вистар, полученных из сертифицированного вивария. Количество экспериментальных животных в группах и проведенных измерений достаточны для проведения статистического анализа результатов. Статистическая обработка результатов проведена с применением соответствующих методов математической статистики.

Исследования проводились на сертифицированном оборудовании с использованием валидированных методик. Ключевые результаты докладывались и обсуждались на международных конференциях: на 28-й Ежегодной Конференции по Гипертонии и Сердечно-сосудистым заболеваниям Европейского Общества Гипертонии (28th Annual Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection of the European Society of Hypertension (ESH) Barcelona June 8-11, 2018), 32-й Конгрессе Европейского Колледжа Нейропсихофармакологии (The 32nd Congress of European College of Neuropsychopharmacology, Copenhagen 7-10 September, 2019), 14 съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2020).

Публикации по теме диссертации

По материалам научного исследования опубликовано 10 работ, из них 4 в международных база данных (Web of Science, Scopus, 1 из 4 – обзорная), они же

входят в журналы, включенные в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета, Перечень ВАК при Минобрнауки России и 6 иные публикации.

Структура и объем диссертации

Объем диссертации составляет 122 страницы машинописного текста, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы и приложения. Содержит 4 таблицы и 25 рисунков. Список литературы включает 159 источников, из которых 129 – зарубежных.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ И ПОДХОДАХ К ЛЕЧЕНИЮ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА, БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ПОТЕНЦИАЛЕ УБИХИНОЛА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Ишемический инсульт

Ишемический инсульт (ИИ) – повреждение ткани мозга и его функций, вызванные нарушением кровоснабжения определённого участка головного мозга вследствие тромбоза или эмболии. Ишемический инсульт во всем мире является наиболее распространенным типом инсульта и ведущей причиной инвалидизации и смертности [71]. Современные подходы к лечению ишемического инсульта основаны на быстром восстановлении кровотока фармакологическим или хирургическим путем в первые часы заболевания, однако сама реканализация сосуда и, как следствие, восстановление кровотока вызывают дополнительные, реперфузионные повреждения [9].

В зависимости от величины кровотока зона ишемического повреждения может быть разделена на необратимо поврежденное ядро инфаркта и прилегающие ткани ишемической полутени – пенумбры. Ядро инфаркта, оставшееся без кровоснабжения, находится в центре зоны повреждения и состоит из мертвой или отмирающей ткани. Вокруг ядра расположена область со сниженным кровотоком (пенумбра), составляющая до половины общего объема поражения, которую можно спасти с помощью ранней реперфузии [5, 142].

Без реперфузии ядро инфаркта может увеличиться в результате гибели нейронов прилегающей зоны пенумбры. Кроме того, гибель первично ишемизированных нейронов впоследствии может повлечь за собой т.н. вторичную потерю других нейронов из-за утраты контакта с ишемизированными нейронами [38]. Именно спасение полутеневых нейронов является главной целью нейропротекторной

терапии [96, 104], для чего необходимо изучение процессов, воздействие на которые могло бы способствовать ограничению последствий ишемии ткани.

Важно отметить, что одним из начальных и повторяющихся звеньев в патогенезе ишемического инсульта является выброс свободно-радикальных форм кислорода и азота, являющихся непосредственной причиной повреждения различных клеточных структур и дальнейшего развертывания цепи событий, ведущих к гибели ткани.

Согласно современным представлениям, в патогенез ишемического инсульта вовлечены множественные механизмы гибели клеток, такие как апоптоз, некроптоз, аутофагия, ферроптоз, партанатоз, фагоптоз и пироптоз (Рисунок 1).

Апоптоз – наиболее обычная форма программированной смерти нейронов после ишемического инсульта без какой-либо воспалительной реакции, приводящая к сжатию клеток и разрушению ядерной мембраны с образованием апоптотических телец [94, 97]. Важно отметить, что в нейронах зоны ишемической полутени апоптоз может быть обратим [121].

Некроптоз – это регулируемая некротическая гибель клеток с образованием некрсом [125], которая зависит от киназной активности протеинкиназы, взаимодействующей с рецептором RIPK1, RIPK3, и псевдокиназы, подобной домену киназы смешанного происхождения (MLKL) [101].

Аутофагия – процесс поглощения цитозольных макромолекул и органелл мембранами с образованием аутофагосом для транспортировки в лизосомы для последующего переваривания и переработки [84]. Превышение порогового уровня аутофагии и накопление аутофагосом, происходящее при гипоксии или ишемии, может привести к гибели клеток [32, 86].

Ферроптоз – железо-зависимая форма регулируемой клеточной смерти, связанная с железо-зависимым перекисным окислением липидов [58, 156]. Характерно, что в отдельных экспериментах ферроптоз удалось частично замедлить добавлением в рацион антиоксиданта – витамина E [145].

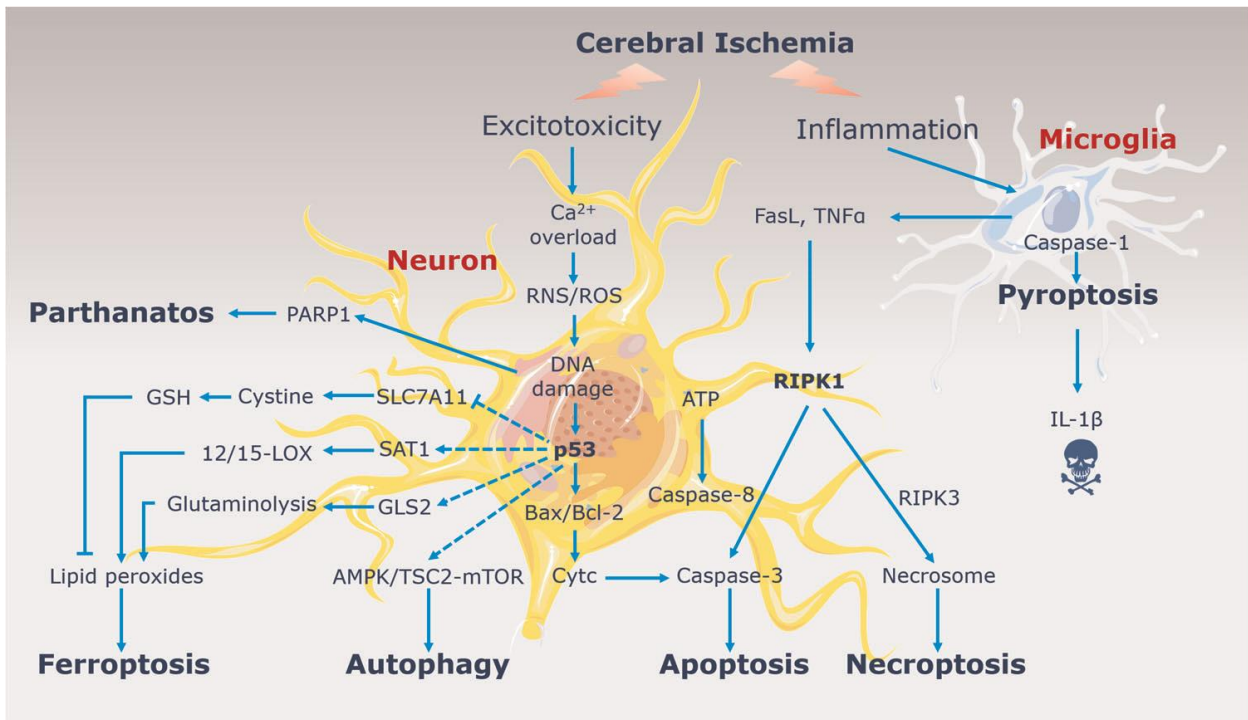


Рисунок 1 – Механизмы клеточной смерти при ишемическом инсульте RNS/ROS – активные формы азота/кислорода; RIPK1 – взаимодействующая с рецептором серин/треонин-протеинкиназа 1; GLC2 – глутаминаза 2; SAT1 – спермидин/спермин N1-ацетилтрансфераза 1. Ишемия вызывает эксайтотоксичность и воспаление, ведущие к повреждению ДНК и активации RIPK1. Активация RIPK1 может вызвать гибель нейрональных клеток через воздействие на каспазу-8: при ее ингибировании – путем некроптоза, при активации – путем апоптоза. При повреждении ДНК p53 опосредует активацию множества проапоптотических генов, что также ведет к апоптозу; через сигнальный путь AMPK/TSC2-mTOR p53 регулирует аутофагию; ингибируя экспрессию SLC7A11 или стимулируя экспрессию SAT1 и GLS2 – инициирует ферроптоз нейронов. Пироптоз клеток микроглии при воспалении происходит в результате процесса, зависящего от каспазы-1 [18, 147]

Партанатос – это PARP 1-зависимая форма гибели клеток, которая может быть активирована повреждением ДНК и лизисом хроматина, вызванными окислительным стрессом [153].

Фагоптоз – это процесс фагоцитоза живых нейронов клетками микроглии, которые являются резидентными мононуклеарными фагоцитами центральной нервной системы [93]. В случае легкой транзиторной ишемии, т.е. в зоне пенумбры нейроны могут выжить и в условиях стресса при воздействии внешних факторов, ингибирующих фагоцитоз [33].

Пироптоз микроглии, опосредованный каспазой-1, сопровождается высвобождением большого количества провоспалительных факторов, индуцирующих гибель нейронов [39, 92,155]. IL-1 β является одним из основных провоспалительных цитокинов, опосредующих нейровоспаление в головном мозге, и может непосредственно индуцировать гибель нейрональных клеток [46].

Механизмы гибели нейронов во время ишемического инсульта продолжают изучаться, и, следовательно, продолжаются поиск и разработка новых лекарственных средств для нейропротекции. Одна из ключевых ролей в патогенезе заболевания принадлежит окислительному стрессу, поэтому продолжают изучаться и обсуждаться нацеленные на него возможные фармакологические стратегии [57].

1.2. Препараты, рекомендуемые для нейропротекции при ишемическом инсульте

Причина ишемического инсульта – нарушение мозгового кровообращения, восстановление которого является первой и главной целью ранней терапии. Для этого в пределах терапевтического окна используют реперфузионные технологии, включающие тромболитическую терапию, механическую тромбоэкстракцию и их сочетание. Однако нарушения, развивающиеся в результате временной ишемии мозга, требуют лечения и профилактики дальнейших осложнений [124].

Результаты отечественных и зарубежных исследований позволили накопить опыт клинического применения препаратов с различным метаболическим действием, способствующих улучшению функционального исхода ИИ.

Российские клинические рекомендации, утвержденные в 2022 году, предлагают использование нескольких нейропротекторов, с различным уровнем убедительности рекомендаций и уровнем достоверности доказательств [9,18].

Депротеинизированный гемодериват крови телят – актовегин (уровень убедительности рекомендаций – В, уровень достоверности – 2). Предполагаемый механизм действия препарата связан с неспецифической активацией клеточного

метаболизма, стимулирующей окислительного фосфорилирования, повышения синтеза углеводов, белков и АТФ, повышает выработку аминокислот участвующих в регуляции биохимических процессов нервной системы. Препарат повышает поглощение и утилизацию кислорода, влияет на транспорт и усвоение глюкозы, что приводит к улучшению энергетического метаболизма в клетках и снижению лактата в условиях ишемии. Назначают с целью улучшения восстановления когнитивных функций и снижения риска постинсультной деменции в восстановительном периоде ишемического инсульта [12, 36].

Винпоцетин (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности доказательств – 4). Механизм действия связан с ингибированием фосфодиэстеразы, это приводит к повышению содержания цАМФ в клетках, вызывает снижение содержания кальция в цитоплазме гладкомышечных клеток и расслабление миофибрилл. Оказывает сосудорасширяющее, антигипоксическое и антиагрегантное действие. Пациентам, перенесшим ИИ в системе ВСА, вне острого периода заболевания рекомендуется применение винпоцетина с целью улучшения процессов церебральной микрогемодинамики и функционального исхода заболевания. Препарат назначается курсом длительностью 14 дней [23, 43,65].

Глицин (уровень убедительности рекомендаций – В, уровень достоверности – 2) Нейропротекторный механизм действия глицина связан с активацией сигнального пути microRNA-301a/c/PТЕН. Глицин увеличивает экспрессию microRNA-301a, которая участвует в дифференцировке клеток, апоптозе и клеточном метаболизме, и обладает нейропротекторным эффектом, за счет подавления экспрессии РТЕН [20, 72]. Назначают в дозе 1 – 2 г/сут в течение первых 5 суток от момента эпизода ишемического инсульта, начиная с шестого часа после развития первых симптомов ИИ. Рекомендован пациентам с острым нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу в каротидной системе. Препарат назначается с целью улучшения противоишемической защиты мозга, улучшения восстановления нарушенных неврологических функций и снижения риска 30-дневной летальности [110].

Метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин – семакс (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности – 3)
Синтетический аналог фрагмента адренкортикотропного гормона (АКТГ). Блокирует основные патогенетические механизмы повреждения мозга, стимулирует эндогенные защитные механизмы, увеличивает уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF), который стимулирует и поддерживает развитие нейронов. Используют в течение первых 5 суток от момента эпизода полушарного ИИ с целью улучшения восстановления неврологических функций [10, 63, 131].

Инозин+никотинамид+рибофлавин+янтарная кислота – цитофлавин (уровень убедительности рекомендаций В, уровень достоверности доказательств – 2). Механизм действия препарата обусловлен входящим в его состав компонентов, оказывает антигипоксантажное и антиоксидантное действие. Улучшает процессы дыхания в клетках, повышает антиоксидантную защиту за счет восстановления активности ферментов, активизирует процессы метаболизма глюкозы и кислорода. Применяют вне зависимости от локализации сосудистого поражения мозга с целью более полного восстановления нарушенных неврологических функций. Лечение следует начинать в первые 10 суток парентерально, а затем продолжать перорально с 11 по 35 сутки [4, 9, 28, 30, 66, 79, 127, 135].

Полипептиды коры головного мозга скота – кортексин (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности доказательств – 2). Нейропротекторный механизм действия препарата основан на предупреждении развития апоптоза и гибели нейронов от поражения эндогенными нейротоксическими факторами на фоне церебральной ишемии. Рекомендован пациентам с ишемическим инсультом в каротидной системе с целью более полного восстановления нарушенных неврологических функций. Лечение следует проводить 2 курсами внутримышечных инъекций в течение 10 суток ИИ с перерывом в 10 суток [7, 12, 26, 67, 69].

Церебролизин (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности доказательств – 2). Применяется в качестве нейропротектора для

защиты нейронов от повреждающего действия лактоацидоза, снижает образование свободных радикалов, предупреждает развитие апоптоза нейронов головного мозга на фоне развития ишемии и гипоксии, уменьшает нейротоксическое действие глутамата. Назначают вне зависимости от локализации сосудистого поражения мозга с целью улучшения функционального исхода заболевания к 3 месяцу заболевания. Препарат применяют в течение первых 12 часов от эпизода ИИ в течение 10 суток (внутривенное капельное введение) [12, 73, 128, 157].

Цитиколин (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности доказательств – 5) Действие основано на восстановлении поврежденных мембран клеток, ингибировании фосфолипаз, ограничивает образование избытка свободных радикалов и предотвращает развитие апоптоза. Рекомендован пациентам с целью улучшения функционального исхода к 3 месяцу заболевания [6, 48,56,61, 99, 130].

Холина альфосцерат (уровень убедительности рекомендаций – С, уровень достоверности доказательств – 3). Относится к группе холиномиметических средств. После реакции расщипления образуется фосфатидил холина, это вещество необходимое для формирования фосфолипидов мембран нейронов. Способствует передаче нервных импульсов в холинергических нейронах, улучшает пластичность мембран нейронов. Назначают для уменьшения неврологического дефицита и повышения способности пациентов к самообслуживанию [2, 14, 34].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат – мексидол (уровень убедительности рекомендаций А, уровень достоверности доказательств – 2) Обладает антиоксидантным, антигипоксантным и мембранопротекторным действием. Нейропротекторный механизм действия связан с прерыванием развития эксайтотоксичности, при котором повышенное образование глутамата приводит к перевозбуждению и дальнейшей гибели клетки. Показан для пациентов, после ИИ в каротидной системе с целью улучшения восстановления неврологических функций. Препарат назначают внутривенно капельно в течение первых 10 суток от эпизода ИИ, а затем перорально в течение 8 недель [15, 134].

подавляющее большинство вышеперечисленных препаратов демонстрируют уровень убедительности рекомендаций не выше В-С и уровень достоверности

доказательств не менее 2-х, т.е. с позиций доказательной медицины не являются абсолютно обоснованными (т.е. имеющими А1). Наибольшим уровнем убедительности рекомендаций и достоверности доказательств обладает мексидол (А2), препарат с антиоксидантными свойствами, для которого показана способность ингибировать свободно радикальные процессы, подавлять перекисное окисление липидов, повышать активность супероксиддисмутазы, уменьшать эндотелиальную дисфункцию, улучшать параметры липидного спектра, оказывать позитивное влияние на реологические свойства крови, осуществлять мембранопротекцию [17, 134].

Японскими клиническими рекомендациями 2004 года для лечения острого ишемического инсульта рекомендован препарат эдаравон – антиоксидант, способный подавлять образование свободных радикалов. Эдаравон может ингибировать гибель нейронов, противодействовать нейротоксичности, вызванной микроглией, и уменьшать длительное воспаление. Он также способен ингибировать ферроптоз, предотвращать окисление липопротеинов низкой плотности [60, 85]. Недавнее крупномасштабное ретроспективное когортное исследование, проведенное в Японии и включившее 10281 пациента с острым ишемическим инсультом, показало, что раннее применение эдаравона в сочетании с ургентной эндоваскулярной реперфузионной терапией способствует улучшению функциональных показателей при выписке, снижению внутрибольничной смертности, уменьшению внутричерепного кровоизлияния [49].

Следовательно, по-прежнему актуален поиск препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами и имеющих в спектре биологических эффектов антиоксидантную активность. Успех нескольких клинических испытаний нейропротекторной эффективности эдаравона подтверждает перспективность этого направления поиска.

1.3. Коэнзим Q10: структура, биологические функции и терапевтический потенциал

Коэнзим Q10 относится к гомологическому ряду соединений, имеющих в своей структуре кольцо бензохинона с изопреновой цепью в шестом положении, состоящей из десяти звеньев [44]. Коэнзим Q10 – единственный эндогенный жирорастворимый антиоксидант, который образуется во всех тканях млекопитающих. Его присутствие показано в различных субклеточных фракциях (лизосомы, аппарат Гольджи, ядро и др.). Коэнзим Q10 синтезируется из мевалоновой кислоты, производных тирозина и фенилаланина и является важным компонентом митохондриальной дыхательной цепи. CoQ10 участвует в переносе электронов с комплексов I и II на комплекс III, где он работает как донор и акцептор протонов, поэтому присутствует в мембранах всех клеток организма в двух формах – окисленной (убихинон) и восстановленной (убихинол). В окисленной форме CoQ10 принимает протоны во время окислительного фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий и восстанавливается до убихинола в результате присоединения двух дополнительных атомов водорода (Рисунок 2). Именно убихинол, выступая в роли донора электронов, проявляет свойства мощного антиоксиданта, способного к эндогенной регенерации благодаря наличию ферментативных систем, которые поддерживают его в восстановленной форме. Убихинол предотвращает перекисное окисление липидов, а также окисление белка и ДНК, опосредованное гидропероксидами липидов, восстанавливает активность других антиоксидантов (токоферола и аскорбата), превосходя их по эффективности [22, 39].

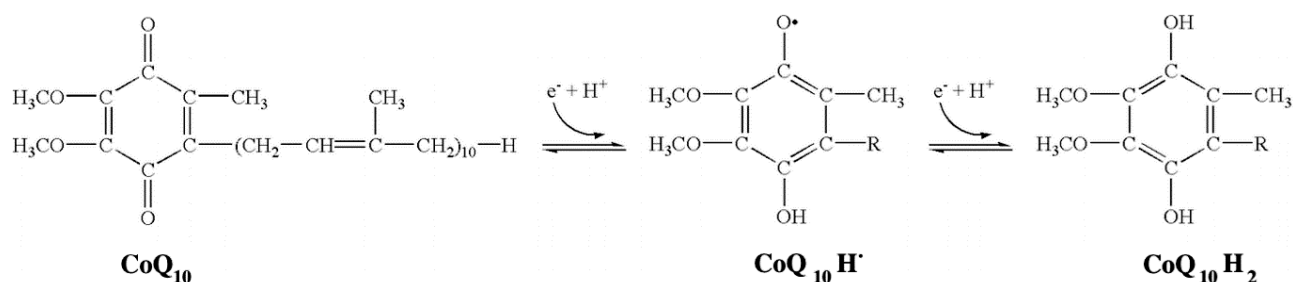


Рисунок 2 – Восстановление убихинона до убихинола через образование семихинона [116]

Соотношение концентраций окисленной и восстановленной форм коэнзима Q10 – редокс-статус рассматривается в качестве маркера наличия оксидативного стресса [133].

Возможность коэнзима Q10 обратимо находится сразу в двух состояниях, предопределяет его существование в организме как в окисленной, так и восстановленной формах. Именно эта способность позволяет ему проявлять весь спектр набора жизненно важных для биологического организма функций [42]. Помимо переноса электронов в Q-цикле Митчелла для производства энергии в дыхательной цепи, этот липид обеспечивает и другие важные функции.

Коэнзим Q10 – единственный эндогенный растворимый в липидах антиоксидант, способный эффективно предотвращать окисление белков, липидов и ДНК. В частности, защищая ЛПНП от окисления, этот липид проявляет антиатеросклеротическое действие; сохраняя эндотелиальный пул оксида азота коэнзим Q10 помогает противодействовать эндотелиальной дисфункции [3,41]. Коэнзим Q10 восстанавливает активность других антиоксидантов – токоферола и аскорбата, способствуя сохранению антиоксидантного резерва. Регенерацию окисленной формы коэнзима Q10 обеспечивают эндогенные ферментативные системы, поддерживая это соединение в активной восстановленной форме.

Коэнзим Q10 участвует в регуляции роста и дифференцировки клеток, контролируя цитозольное соотношение НАД⁺/НАДН в плазматических мембранах большинства клеток через CoQ-зависимую НАДН-оксидазу.

Коэнзим Q10 – это одно из соединений, препятствующих апоптозу путем предотвращения открытия митохондриальных пор временной проницаемости, что

противодействует истощению АТФ, высвобождению цитохрома С в цитозоль, активации каспазы-9, деполяризации мембранного потенциала митохондрий и в итоге фрагментации ДНК.

Коэнзим Q10 является обязательным кофактором в процессе переноса протонов от жирных кислот с наружной на разобщенные белки внутренней мембраны митохондрий, поддерживая теплопродукцию в клетке.

Основная часть коэнзима Q10 в тканях находится в форме убихинола; например, в крови и печени его уровень достигает 95-96%, в сердце – 61%; в отдельных органах редокс-статус смещен в окисленную сторону: в головном мозге убихинола – только 23% от общего содержания коэнзима Q10, в легких – 25% [82].

Окисленная форма коэнзима Q10 – убихинон, молекулярная масса 863,34 г/моль, это оранжевый порошок, стабильный при комнатной температуре, практически нерастворимый в воде, с ограниченной растворимостью в жирах и органических растворителях. Восстановленная форма коэнзима Q10 (убихинол), молекулярная масса 865,36 г/моль, – белый кристаллический порошок, крайне нестабильный. Промышленная субстанция убихинола представляет собой его стабилизированные формы [47]. Обе молекулы гидрофобны, но убихинол гидрофильнее убихинона, т.к. содержит два дополнительных атома водорода, увеличивая этим полярность «головы» молекулы убихинола [137].

Биодоступность убихинона при приеме внутрь крайне низкая: по некоторым данным не более 2% [83,152]. Недавно было показано, что абсорбция коэнзима Q10 через кишечный эпителий происходит с участием транспортного белка Niemann-Pick C1 Like 1 protein, способствующего кишечной абсорбции и других жирорастворимых компонентов пищи, в т.ч. токоферола и холестерина [146]. Межиндивидуальные различия в количестве этого белка-транспортера, по-видимому, обуславливают высокую вариабельность биодоступности коэнзима Q10 при приеме per os. На культурах нормальных и коэнзим Q10-дефицитных эндотелиальных клеток, используемых в качестве модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), показано, что в норме транспорт коэнзима Q10 в обе стороны происходит в связанном с липопротеидами виде по механизму трансцитоза. При

этом захваченные рецептором-скавенджером (SRB1) и рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE) липопротеиды удаляются обратно посредством рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR). Это нивелирует приток коэнзима Q10 в клетки сосудистого эндотелия, делая ГЭБ непроницаемым для этого липида. В культуре клеток с дефицитом коэнзима Q10 плотные контакты разрываются, открывая путь для проникновения веществ в ткань мозга, минуя клетки эндотелия [3,154].

Имеются данные о лучшей биодоступности при приеме внутрь убихинола по сравнению с убихиноном. В экспериментальном исследовании на мышах [150] сравнивали биодоступность водорастворимых форм убихинола и убихинона одного производителя в одинаковых дозах (240 мг/кг/сутки на протяжении 2 месяцев, Kaneka Corporation, Japan) солюбилизированных с декстрином. Было показано, что после приема обеих форм коэнзима Q10 общая его концентрация возросла в плазме крови до 1,36 мкМ после убихинона и до 2,06 мкМ после убихинола, в митохондриях головного мозга – почти в 2,5 раза после приема убихинола, но практически не изменилась после приема убихинона [11].

В работе [45] у здоровых людей изучали относительную биодоступность нескольких препаратов, содержащих коэнзим Q10 в окисленной или восстановленной форме. Уровни коэнзима Q10 в плазме измеряли в течение 2-х недель после однократного приема препаратов в дозе 180 мг. Преимущество по биодоступности показала лекарственная форма убихинола в виде мягких желатиновых капсул с масляным раствором. В исследовании [70] у добровольцев сравнивали биодоступность двух препаратов коэнзима Q10, один из которых был представлен в восстановленной форме. У пациентов, принимавших убихинол (100 мг/кг), по сравнению с пациентами, принимавшими окисленный коэнзим Q10 в той же дозе, выявлены значительно более высокие плазменные уровни убихинола и общего пула коэнзима Q10, более раннее достижение максимальной концентрации (15,5 и 26,5 ч, соответственно); площадь под кинетической кривой была в 4,3 раза больше. В исследовании [89] у здоровых людей оценивали относительную биодоступность убихинола (200 мг в день) и убихинона (200 мг в день), используя

одинаковую лекарственную форму – мягкие желатиновые капсулы с одинаковыми вспомогательными веществами (наполнителями). Оба препарата увеличивали содержание коэнзима Q10 в плазме крови через 4 недели приема, однако биодоступность убихинола была выше: уровни CoQ10 возрастали от 0,9 до 2,5 мкг/мл и до 4,3 мкг/мл после приема убихинона и убихинола, соответственно.

Фармакокинетику препарата убихинола Kaneka QH™ изучали у добровольцев при однократном (150 и 300 мг) и многократном (4 недели; 90, 150 и 300 мг один раз в сутки) приеме внутрь [75]. Авторы выявили отсутствие побочных эффектов; максимальные концентрации и площади под кинетическими кривыми с увеличением дозы возрастали непропорционально, из чего был сделан вывод о нелинейном характере фармакокинетики убихинола [25]. Нелинейность фармакокинетики была показана и при внутривенном введении как убихинона (в дозах 10 и 30 мг/кг) [68], так и убихинола (в дозах 5-20 мг/кг) [118].

На повышение биодоступности коэнзима Q10 при пероральном приеме существенное значение оказывает лекарственная форма этого вещества. Так, солубилизированные, нанодисперсные и водорастворимые субстанции могут иметь преимущество над обычными [139].

1.4. Фармакологическая эффективность убихинола в эксперименте и клинической практике

Убихинон, окисленная форма коэнзима Q10, исследован в эксперименте на различных моделях *in vitro* (на клетках) [51, 102] и *in vivo* (у животных) [117, 120] и давно нашел применение в клинической практике [37, 95]. Очевидно, что ведущая роль в достижении протекторных эффектов убихинона обусловлена антиоксидантными свойствами, реализуемыми после его превращения в организме в восстановленную форму – убихинол. Типична ситуация, когда, рассматривая возможное терапевтическое применение убихинола, авторы на самом деле оценивают результаты применения убихинона, подразумевая его переход в организме в восстановленную форму [40, 55]. Фармацевтические композиции с

убихинолом появились на мировом фармацевтическом рынке лишь в начале 2000-х годов [88], и эффективность убихинола как самостоятельного фармакологического агента исследована недостаточно.

Приведем краткий обзор имеющихся на сегодняшний день результатов экспериментальных и клинических исследований эффективности убихинола при различных патологических состояниях.

Заболевания сердечно-сосудистой системы

Несколько исследований было посвящено оценке влияния убихинола на сердечно-сосудистую систему. В экспериментальном пилотном исследовании [136] изучали влияние убихинола на функцию сердца крыс линии Dahl S, являющейся генетически обусловленной моделью гипертонии. Высокое содержание соли в их диете приводит к быстрому повышению артериального давления, прогрессирующей гипертрофии левого желудочка и развитию изолированной сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса. На фоне солевой диеты у крыс контрольной группы средние значения артериального давления возросли примерно на 55 мм рт.ст и достигли уровня 154 мм рт.ст. У крыс, получавших в течение 12 недель наряду с солевой диетой убихинол (20 мг/кг/день), средний уровень артериального давления уменьшился примерно на 8 мм рт.ст по сравнению с первоначальным и составил 94 мм рт.ст. Толщина стенки левого желудочка сердца у крыс, получавших убихинол, практически не изменилась в отличие от контрольной группы: прирост составил 0,067 мм и 1,1 мм, соответственно. Электронная микроскопия выявила у контрольных крыс существенные повреждения митохондрий кардиомиоцитов, включая набухание и даже деструкцию крист, и относительно интактные митохондрии с нормальными кристами у леченых животных.

P. H. Langsjoen с соавт. [90] опубликовали результаты исследования по лечению 7 пациентов с тяжелой формой ХСН в IV стадии. В начале исследования пациенты находились на лечении убихиноном (150-600 мг/сут), однако плазменный уровень

коэнзима Q10 не поднимался выше 1,6 мкг/мл. Спустя 9-20 месяцев после перехода на прием убихинола (450-900 мг / сут) у пациентов уровень плазменного коэнзима Q10 увеличился до 6,5 мкг/мл. В результате фракция сердечного выброса возросла в среднем с 22% до 39%, что позволило улучшить функциональный класс пациентов с IV до II.

S. Onur с соавт. [113] продемонстрировали, что в плазме крови больных, перенесших инфаркт миокарда, по сравнению со здоровыми людьми снижено содержание эндогенного убихинола и общего пула коэнзима Q10, а доля окисленной формы увеличена. В этом же исследовании у здоровых людей выявлена отрицательная корреляционная связь между плазменными уровнями убихинола и NT-proBNP; высокие уровни последнего, как известно, связаны с повышенным риском сердечно-сосудистых событий. После 14 дней приема убихинола (150 мг/день) было обнаружено снижение экспрессии одного из генов (CLCN6), связанных с уровнем NT-proBNP. Авторы делают вывод, что прием убихинола может обеспечить кардиопротекцию [25].

В исследовании Zozina V.I. с соавт. [138] изучали концентрацию убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 и его редокс статус в плазме крови у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) на фоне стандартной терапии и с дополнительным приемом убихинола или убихинона. Количественное определение концентрации коэнзима Q10 проводили методом ВЭЖХ – МС/МС. Изначально, уровень общего коэнзима Q10 у пациентов с ИБС был достоверно ниже, чем в контрольной группе без ИБС. В крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, которые принимали дополнительно убихинол или убихинон, отмечено повышенное содержание убихинола, суммарного коэнзима Q10 и его редокс-статуса по сравнению с группой стандартной терапии, не различающееся с показателями контрольной группы без ИБС. Авторы отмечают, что назначение убихинола и убихинона может повысить антиоксидантный потенциал организма пациентов, что является дополнительной защитой при ИБС.

Zlatohlavek с соавт. [158] показали, что 6-месячный прием восстановленной формы коэнзима Q10 приводит к снижению мышечной слабости и боли у

пациентов с миопатией, вызванной приемом статинов. Уровни коэнзима Q10 в плазме при этом возрастали почти в 3 раза, снижался уровень липопротеинов низкой плотности (13%).

Пропионовая ацидурия

Врожденное заболевание, вызванное дефицитом митохондриального фермента пропионил-СоА карбоксилазы (биотина), при котором наиболее страдают органы с высокими энергетическими потребностями: сердце, нервная система и скелетная мускулатура. У пациентов с пропионовой ацидурией был выявлен сниженный плазменный уровень коэнзима Q10 [115]. Курс убихинола 10 мг/кг/день в течение 6 месяцев не только повысил содержание коэнзима Q10 в плазме пациентов, но и способствовал повышению почечной экскреции интермедиатов цикла Кребса – цитратов и отношения цитраты/метилцитраты, что отражает улучшение анаплероза.

Антиоксидантный эффект убихинола использовали для коррекции ряда других патологических состояний, сопряжённых с оксидативным стрессом.

Синдром хронической усталости

Так, прием убихинола (150 мг/день на протяжении 12 недель) оказался эффективным у пациентов с синдромом хронической усталости: выраженность депрессивных симптомов снижалась пропорционально возрастанию концентрации коэнзима Q10 в плазме [151].

У крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином, 2-х недельный прием как убихинола, так и убихинона (5 мг/кг/день) уменьшал плазменные уровни малонового диальдегида (МДА) – индикатора выраженности оксидативного стресса [25, 117].

Нефротоксичность

На модели нефротоксичности, вызванной у крыс циклоспорином, положительный эффект убихинола (600 мг/кг/сут в течение четырёх недель) проявлялся в двукратном снижении уровней альбумина в моче и супероксид-аниона в почке; также уменьшались уровни креатинина в крови и экспрессия TGF-бета в клетках проксимальных почечных канальцах [25, 82].

На модели ишемии/реперфузии почки у крыс после предварительного применения убихинола (300 мг/кг в течение 7 дней) оценивали степень повреждения органа по морфологическим, функциональным показателям, маркерам окислительного стресса и уровню воспалительного маркера TNF-alpha. Введение убихинола нормализовало клиренс креатинина практически до начального уровня, предотвратило истощение супероксиддисмутазы; концентрация TNF-alpha была значительно ниже. По морфологическим признакам отмечали улучшение ультраструктуры почки [25, 114].

Геморрагический шок

На модели контролируемого геморрагического шока у животных внутривенное введение убихинола (1 мг/100 г в форме липосом) приводило к уменьшению уровня маркеров окислительного стресса (митохондриальный супероксид и пероксид водорода) и апоптоза в легких, диафрагме, сердце и почках [64]. На той же модели в другом исследовании оценивали влияние убихинола (1 мг/100 г, внутривенно в форме липосом) на уменьшение микрососудистого воспаления. В результате применения убихинола прирост активных форм кислорода был в два раза меньше, чем в контрольной группе. Убихинол остановил повышение уровня адгезии лейкоцитов и снизил уровень дегрануляции тучных клеток [148].

Бесплодие

В последние годы особое внимание привлекла теория об усиленной генерации свободных радикалов как причины бесплодия [141]. Показано, что прием убихинола в течение 6 месяцев (150-200 мг/сутки) улучшает морфологию, скорость передвижения сперматозоидов [62, 149] и увеличивает их количество [149]. У женщин показано влияние убихинола на уровни ФСГ и ЛГ. В группе из 50 бесплодных пациенток, которые принимали убихинол (150 мг/сутки в течение 4-х месяцев), значения пролактина были уменьшены по сравнению с нормой при повышенных уровнях прогестерона; концентрация ФСГ увеличилась в 3 раза в пределах нормы, а уровень ЛГ в два раза превысил границу нормы [25, 62].

Аутизм

Благоприятный эффект убихинола на поведенческие расстройства был продемонстрирован у детей с аутизмом [106]. Этиология этого заболевания мало изучена; тем не менее, существуют исследования, подтверждающие, что оксидативное повреждение и нарушение генерации энергии в митохондриях являются основными факторами, определяющими начало заболевания [100]. В исследовании принимали участие 24 ребенка в возрасте 3-6 лет, которым давали внутрь по 50 мг убихинола два раза в день в течении 3-х месяцев; данные собирали до и через 3 месяца лечения путем анкетирования родителей. В результате терапии у детей улучшились такие симптомы как общение с родителями – на 12%, вербальные коммуникации – на 21%, игры с друзьями – на 42%; улучшение сна отмечалось у 34% детей, пищевой отказ снизился на 17%, агрессивность и аутоагрессия уменьшились на 13% и 14%, соответственно [25, 106].

Исследование окислительно-восстановительного статуса плазмы крови у детей с трихосомией 21 показало наличие признаков оксидативного стресса: плазменные уровни убихинола были ниже, чем у здоровых детей, и редокс-статус сдвинут в окисленную сторону. Прием убихинола (50 мг/день внутрь в течение трех месяцев)

привел к возрастанию плазменных уровней общего коэнзима Q10 (от 0,76 до 8,84 $\mu\text{mol/L}$) и убихинола (от 0,66 до 8,2 $\mu\text{mol/L}$). Окислительно-восстановительный баланс нормализовался и по показателям приблизился к значениям у здоровых детей. Полученные результаты дают основание для изучения клинической эффективности убихинола при данной патологии [25, 50].

Нейродегенеративные заболевания

Ряд исследований посвящен изучению эффективности убихинола как нейропротектора. У больных с тяжелым нейродегенеративным заболеванием – семейной мультисистемной атрофией с гетерозиготной мутацией гена *COQ2*, который кодирует фермент в цепи биосинтеза коэнзима Q10, были снижены исходные значения коэнзима Q10 в плазме (0,33 vs 0,72 мкг/мл) и спинномозговой жидкости ($0,22 \cdot 10^{-3}$ vs $0,35 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл). Лечение убихинолом в высоких дозах (840 и 1200 мг/день) в течение 3-х лет обеспечило существенное повышение уровня коэнзима Q10 и в плазме крови (4,78 мкг/мл), и в спинномозговой жидкости ($14,06 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл). На протяжении трех лет лечения не было выявлено ухудшения в клиническом проявлении заболевания. Наблюдавшееся при этом увеличение скорости мозгового окислительного метаболизма кислорода без изменений мозгового кровотока предполагает улучшение митохондриального метаболизма в мозге [25, 143]. К сожалению, в исследовании не представлена группа сравнения.

В клиническом исследовании на пациентах с болезнью Паркинсона была показана способность убихинола (300 мг/день в течение 48 недель) повышать эффективность лечения леводопой, что проявлялось в уменьшении симптомов заболевания (тремор, брадикинезия и т.д.) [122].

Используя модель болезни Альцгеймера, индуцированной пероральным введением крысам хлорида алюминия в дозировке 75 мг/кг, старым животным одновременно вводили коэнзим Q10 в дозировке 10мг/кг в течение 60 дней. В результате исследования у крыс улучшились обучаемость, память и понизились уровни маркеров воспаления [52].

В исследовании, проведенном на мышах с признаками бокового амиотрофического склероза, сравнивали эффективность убихинола и убихинона (800 мг/кг/сут, per os). Лечение проводили от появления признаков заболевания и до конца жизни; оценивали моторные функции и выживаемость. Хотя плазменные уровни и убихинола и убихинона значительно возрастали, общий уровень коэнзима Q10 в головном и спинном мозге после лечения увеличился в среднем лишь на 10% по сравнению с контролем. Эффекта на прогрессирование заболевания и продолжительность жизни отмечено не было, что возможно, было связано с недостаточным поступлением исследуемых веществ в ЦНС [31].

Мышам с митохондриальной энцефалопатией, связанной с дефицитом коэнзима Q10, в течение 2-х месяцев давали убихинон или убихинол (по 240 мг/кг/сутки). После приема убихинола возрастание концентрации коэнзима Q10 в плазме крови и митохондриях головного мозга сопровождалось улучшением структуры тканей головного мозга (гистологическое исследование), снижением окислительного повреждения ДНК в результате нормализации коэнзим-зависимой деятельности дыхательной цепи. Прием убихинона не влиял на уровни коэнзима Q10 в митохондриях головного мозга и не улучшал гистологическую картину ткани головного мозга [25, 150].

Ишемический инсульт

Наряду с уже доказанной ролью окислительного стресса [87, 126] и, конкретно, эндогенных плазменных уровней коэнзима Q10 [132] в патогенезе ишемического инсульта, исследований эффективности убихинола при данной патологии не проводилось. При этом имеется небольшое количество публикаций по изучению нейропротекторного действия окисленной формы коэнзима Q10 при ишемическом инсульте [54, 81, 132, 140].

В исследовании Simani L. и соавт. У здоровых добровольцев и пациентов в первые сутки ишемического инсульта оценивали неврологический статус и плазменные уровни общего коэнзима Q10, SOD и малондиальдегида. На фоне

инсульта сниженные более чем в 2 раза уровни коэнзима Q10, SOD и повышенное содержание малонового диальдегида находились в прямой взаимосвязи с выраженностью неврологического дефицита [132].

Ramezani M. И соавт. В 2020 году провели оценку эффективности 4-х недельного курса приема внутрь коэнзима Q10 в дозе 300 мг в день у пациентов в остром периоде ишемического инсульта. К концу лечения отмечались значимо более высокие плазменные уровни коэнзима Q10 и более успешное восстановление неврологических функций в сравнении с группой, получавшей плацебо [54].

Нейропротекторный эффект коэнзима Q10 при внутривенном введении впервые показан на модели фокальной ишемии-реперфузии мозга крысы (middle cerebral artery occlusion, МСАО) в исследовании Белоусовой М. в 2016 году. Через 24 часа от начала реперфузии у животных контрольной группы в ишемизированном полушарии выявлено снижение уровней коэнзима Q10 на 24%. Раствор препарата вводили после 45 минут ишемии за 15 минут до начала реперфузии в концентрации 30 мг/кг. По прошествии 24 часов в группе животных, получивших инъекцию препарата, было выявлено снижение смертности в 2,4 раза, объема инфаркта мозга на 67%, улучшение неврологического статуса (в 1,5 раза) по сравнению с контрольными животными [81]. Позже с использованием схожего протокола исследования (МСАО, в/в введение коэнзима Q10 в дозировке 30 мг/кг) Ghasemloo E. с соавт. Также показали значительное снижение объема инфаркта, выраженности отека мозга и неврологического дефицита [140].

В недавнем исследовании по изучению влияния убихинола, введенного внутривенно, на эндотелий сосудов мозга и проницаемость ГЭБ показана способность убихинола менять структурно-функциональную активность клеток, формирующих ГЭБ. Исследование проводили на самцах крыс Вистар. Животным однократно вводили раствор убихинола в дозировке 30 мг/кг. Убихинол вызывал увеличение количества клеток, несущих маркер CD31, в энторинальной коре в течении 2-24ч, с последующим нарастанием CLDN5 в течении 96-192ч после воздействия. Полученные данные о снижении интенсивности апоптоза позволяют рассматривать внутривенные формы убихинола в качестве перспективного агента

для коррекции дисфункций ГЭБ и ограничения отсроченных постинсультных повреждений головного мозга [3].

Таким образом, первые результаты экспериментальных и клинических исследований восстановленной формы коэнзима Q10 – убихинола как самостоятельного фармакологического агента указывают на перспективность его применения при патологических состояниях, сопряженных с окислительным стрессом. При этом сохраняется актуальность поиска препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами, в т.ч. имеющих в спектре биологических эффектов антиоксидантную активность. Наибольший интерес на сегодняшнем этапе представляет экспериментальная оценка эффективности убихинола в лечении ургентных ишемических состояний с помощью внутрисосудистого введения, которое обеспечивает быстрое повышение плазменных уровней антиоксидантной, восстановленной формы коэнзима Q10 и возможность коррекции тканевого окислительно-восстановительного дисбаланса в ишемизированных тканях. Использование убихинола и убихинона в форме растворов для внутривенного введения в равных дозах и с одинаковым составом вспомогательных веществ позволит сравнить фармакокинетику и эффективность этих двух субстанций (Таблица 1) [25, 29].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Изучаемые препараты

Таблица 1 – Исследуемые вещества

	Исследуемое вещество	Состав препарата	Количество вещества
1.	Убихинол 1% (10 мг/мл) раствор для внутривенного введения АО «НПО «Дом Фармации», Россия	<i>Действующее вещество:</i> Убидекаренол (Канека, Япония) <i>Вспомогательные вещества:</i> Макрогол глицерилрицинолеат (Ph. Eur., 6.0, p.2304) Полисорбат 20 (Ph. Eur., 6.0, p.2709) Аскорбиновая кислота (ФС 42- 0218-07) Натрия эдетат (ГОСТ 10652-73) Натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02)	10 мг 80 мг 40 мг 1,0 мг 0,5 мг до 1 мл
2.	Убихинон 1% (10 мг/мл) раствор для внутривенного введения АО «НПО «Дом Фармации», Россия	<i>Действующее вещество:</i> Убидекаренон (Канека, Япония) <i>Вспомогательные вещества:</i> Макрогол глицерилрицинолеат (Ph. Eur., 6.0, p.2304) Полисорбат 20 (Ph. Eur., 6.0, p.2709) Аскорбиновая кислота (ФС 42- 0218-07) Натрия эдетат (ГОСТ 10652-73) Натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02)	10 мг 80 мг 40 мг 1,0 мг 0,5 мг до 1 мл

Продолжение Таблицы 1

3.	Плацебо раствор для внутривенного введения АО «НПО «Дом Фармации», Россия	<i>Вспомогательные вещества:</i> Макрогол глицерилтрицинолеат (Ph. Eur., 6.0, p.2304) Полисорбат 20 (Ph. Eur., 6.0, p.2709) Аскорбиновая кислота (ФС 42- 0218-07) Натрия эдетат (ГОСТ 10652-73) Натрия хлорида изотонический раствор для инъекций (ФСП 42-0048-3331-02)	80 мг 40 мг 1,0 мг 0,5 мг до 1 мл
4.	Физиологический раствор (Натрия Хлорид 0,9%) ООО «Гротекс»	<i>Действующее вещество:</i> Натрия хлорид <i>Вспомогательные вещества:</i> Вода для инъекций	9,0 до 1000 мл

2.2. Животные для проведения эксперимента

Экспериментальная часть диссертационного исследования выполнена на взрослых крысах-самцах линии Вистар с весовым интервалом 290-320гр, полученных из вивария Института медико-биологических проблем РАН, Россия. За 7 дней до введения животных в эксперимент они были оставлены в карантинной зоне вивария МГУ имени М. В. Ломоносова в клетки со стерильным кукурузным подстилом, доступ к воде и еде – без ограничений. Крысы находились в условиях с искусственно созданным цикловым режимом по 12-часов день/ночь. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией МГУ имени М. В. Ломоносова. Необходимые для эксперимента процедуры, проводили в соответствии с рекомендациями, описанными в восьмом издании «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» [1, 35].

2.3. Общая анестезия

Все хирургические операции животным проводились под общей анестезией в стерильных условиях при соблюдении правил асептики и антисептики. Крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением хлоралгидрата 300 мг/кг, предварительно растворенном в 0,9% изотоническом растворе. Для установления глубины хирургического наркоза действовали в соответствии с рекомендациями «Оценки глубины анестезии» [98].

2.4. Внутривенное введение препаратов

Животным под общей анестезией проводили постановку полиэтиленового катетера в бедренную вену для дальнейшего введения исследуемых веществ.

Наркотизированное животное фиксировали на подогреваемом столике (для предотвращения гипотермии). Внутреннюю часть бедра задней лапы животного выбривали, обрабатывали кожным антисептиком трехкратно (Эстилодез, ООО «Полисепт», Россия) от центра к периферии. Лапу животного отодвигали в сторону, фиксировали и визуально определяли бедренную вену. Далее выполняли рассечение тканей длиной 1,5 см перпендикулярно бедренной вене. При помощи браншей («тупым» методом) послойно раздвигали мышцы. Выделяли нервно-сосудистый пучок освобождали от спаек, браншами выделяли вену, при этом сохраняя ее полнокровность. Лигатуру накладывали на дистальную часть вены и плотно затягивали. Проксимальную часть вены обвязывали вокруг и не затягивали. Сосудистыми ножницами выполняли рассечение вены «до капли крови», сосудистый пинцет вводили в вену и по нему продвигали полиэтиленового катетер внутрь сосуда в направлении брюшной полости. Лигатуру затягивали вокруг катетера, фиксируя его внутри сосуда. Правильность постановки определяли появлением крови внутри катетера при оттягивании поршня шприца на себя. Вводили необходимое количество исследуемых препаратов по протоколу. Катетер вынимали, лигатуру плотно затягивали, для предотвращения венозного

кровотечения. Ткани ушивали послойно узловым швом. Шов обрабатывали 0,05% водным раствором хлоргексидина и 5% спиртовым раствором йода. Животное помещали в отдельную клетку на бумажную подстилку для предотвращения асфиксии. Наблюдали до выхода из наркоза, перекладывали в индивидуальную клетку с кукурузным подстилом и неограниченным доступом к воде и корму.

2.5. Оценка неврологического дефицита по протоколу mNSS

Животным, независимо от протокола исследования, до и после операции проводили оценку неврологического дефицита по модифицированной шкале неврологического дефицита (modified Neurological Stroke Score; mNSS). Анализировали двигательные функции и нарушение чувствительности по шкале от 0-3, по 6 показателям (4 теста – двигательные функции, 2 теста – нарушение чувствительности), общий итог у здорового животного соответствует 18 баллам, минимальные баллы у больного животного – 3 (Таблица 2) [1].

Таблица 2 – Протокол оценки неврологического дефицита

Тест	Оценка			
	0	1	2	3
1. Спонтанная активность (в клетке в течение 5 мин)	Нет движения	Едва двигается	Двигается, но не приближается по крайней мере к 3-м сторонам клетки	Двигается и подходит по крайней мере к 3-м сторонам клетки, встает на задние лапы
2. Симметричность движения (четырьмя конечностями)	Передняя конечность на пораженной стороне не двигается	Конечности на пораженной стороне демонстрируют минимальное движение	Конечности на контралатеральной стороне выступают меньше, чем на ипсилатеральной стороне	Все четыре конечности разгибаются симметрично
3. Вытягивание передних лап при подвешивании за хвост	Передняя конечность на пораженной стороне не двигается	Передняя конечность на пораженной стороне ограничена в движении	Передняя лапа на пораженной стороне вытянута меньше, чем здоровая и движение конечности ослаблено	Передние конечности вытянуты одинаково, ходьба на передних лапах симметричная
4. Взбирание по вертикальной сетке	Нет движения	Падение при подсаживании на вертикальную сетку	Медленно поднимается, пораженная сторона ослаблена, не сжимает прутья сетки сильно или отпускает по сравнению со здоровой стороной	Поднимается, крепко сжимает обеими передними лапами

Продолжение Таблицы 2

Тест	Оценка			
	0	1	2	3
5. Реакция на прикосновения к телу	Нет реакции на прикосновения по обеим сторонам тела	Нет реакции на прикосновения к пораженной стороне тела	Слабая реакция на прикосновения к пораженной стороне тела	Животное одинаково реагирует на прикосновения к обеим сторонам тела
6. Реакция на прикосновение к вибрисам	Нет реакции на прикосновение к вибрисам с обеих сторон	Нет реакции на прикосновение к вибрисам с пораженной стороны	Слабая реакция на прикосновение к вибрисам с пораженной стороны	Животное одинаково реагирует на прикосновение к вибрисам с обеих сторон

2.6. Эвтаназия

Эвтаназию животным проводили, используя передозировку раствора хлоралгидрата (интраперитонеально), предварительно растворенного в изотоническом растворе в концентрации 1 г/кг веса животного и введением 0,5мл 3М раствора KCl внутрисердечно.

2.7. Аналитические методы исследования

2.7.1. Подготовка биоматериала к анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Экстракцию коэнзима Q10 из плазмы крови проводили по методике, модифицированной Калениковой Е. И. [82]. К предварительно размороженной при комнатной температуре плазме в количестве 100мкл добавляли 200мкл 96% этанола и 500мкл н-гексана, энергично перемешивали на протяжении 10 минут, помещали в центрифугу и оставляли течение 3 мин при 3000 об/мин, для

разделения слоев. Далее отбирали слой гексана находящийся сверху, и к остатку снова добавляли 500мкл н-гексана, для проведения повторной экстракции. Слои гексана соединяли вместе, высушивали и определяемое вещество смешивали со 100мкл 96% этанола.

Для определения содержания коэнзима Q10 в тканях органов, органы или их части (головной мозг делили на 2 части, каждую заворачивали в пищевую пленку для предотвращения высыхания и алюминиевую фольгу для защиты от солнечного света и окисления убихинола) замораживали и хранили при температуре -70°C . Перед анализом предварительно замороженные ткани мозга, левого желудочка, печени, почек размораживали при комнатной температуре. Точную навеску левого желудочка сердца, печени или почек, взвешенную на аналитических весах, гомогенизировали в деионизированной воде, а мозг – в этаноле в соотношении 1:4 (вес/объем, г/мл). Измельчали механическим гомогенизатором в течение 30-40 сек в зависимости от объема и массы измельчаемого органа до получения гомогената, который возможно дозировать автоматической пипеткой. Часть гомогената использовали в хроматографическом исследовании сразу для оценки уровня коэнзима Q10 в органах, остаток замораживали при -70°C и хранили не более 3 недель, при необходимости использовали для перепроверки получаемых результатов.

Коэнзима Q10, из тканей головного мозга крыс, экстрагировали путем смешивая 100мкл гомогената в спирте с добавлением 250 мкл н-гексана (соотношение 2:5), тщательно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут и верхний слой гексана помещали в эппендорф. Вновь смешивали с 250 мкл н-гексана и повторяли процедуру экстракции и отбора верхнего слоя гексана. Объединенный экстракт высушивали и смешивали с 96% этанолом.

Коэнзим Q10 из сердца, почек, печени экстрагировали по тем же правилам, что и из плазмы крови. К 100мкл гомогенизированного органа добавляли 200мкл 96% этанола и 500мкл н-гексана энергично перемешивали в течении 10 минут, помещали в центрифугу и оставляли на скорости 3000 об/мин в течение 3 мин, для разделения слоев. Отбирали верхний слой, к остатку снова прибавляли 500мкл н-

гексана и проводили повторную реэкстракцию. Слои н-гексана сливали вместе, высушивали и только перед ВЭЖХ-анализом растворяли в 100мкл 96% этанола [11,83].

2.7.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Реактивы и оборудование

Этанол 96%, вода деионизированная (Миллипор) Millipore, Натрия хлорид (Merck), Метанол (Merck), Н-гексан (HPLC grade), Хлорная кислота 60%, (HPLC grade, Fluka), Натрия тетрагидроборат (Acros organics).

Жидкостный хроматограф Стайер-М (Аквилон, Россия), изократический режим элюирования, электрохимический детектор «Coulchem III» (Termo scientific, USA), ячейка ESA 5011(ESA Inc, USA), колонка Phenomenex, Luna C18, 150x4,6 мм, 5μм. Фильтр Millipore Direct Q3 (получение деионизированной воды), механический гомогенизатор ИКА T25 (Германия), аналитические весы LA-60 (Acculab) центрифуга CM-50. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали в программе МультиХром (ООО Амперсенд, Россия).

Приготовление стандартных калибровочных растворов

Навеску убихинола или убихинона 10 мг отвешивали на аналитических весах, далее растворяли в 1 мл этанола (растворитель отмеряли микропипеткой НТЛ с одноразовым наконечником). Пробирку помещали в теплую воду для ускорения растворения субстанции. Полученный раствор последовательно разводили этанолом в диапазоне концентраций от 10 мг/мл до 0,25 мкг/мл.

Стандартные разведения и жидкие биоматериалы (плазма, гомогенаты тканей) дозировали по объему микропипетками НТЛ с рабочим диапазоном 20-200мкл и 100-1000мкл.

Полученные экстракты биоматериалов, перерастворенные в этаноле, анализировали методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором, в изократическом режиме. Скорость потока элюэнта составляла 1,4 мл/мин, время выхода пика для Коэнзим Q10 регистрировали на 8,6 мин. Состав подвижной фазы: NaCl, метанол, HClO₄ (в соотношении 975:15:10). Объем пробы, вводимой в инжектор – 10мкл. Показатели электрохимического детектора устанавливали в диапазоне -50мВ +350мВ (на 1 и 2 паре электродов соответственно), измерение проводили в окислительном режиме. Коэнзим Q10 в экстракте последовательно восстанавливали 5% раствором NaBH₄ в этаноле. Полное восстановление коэнзима Q10 определяли по высоте пика. Если после внесения восстановителя пик не возрастал, то пробу считали полностью восстановленной, и в расчет брали наибольшее из полученных значений [8,11] (Рисунок 3).

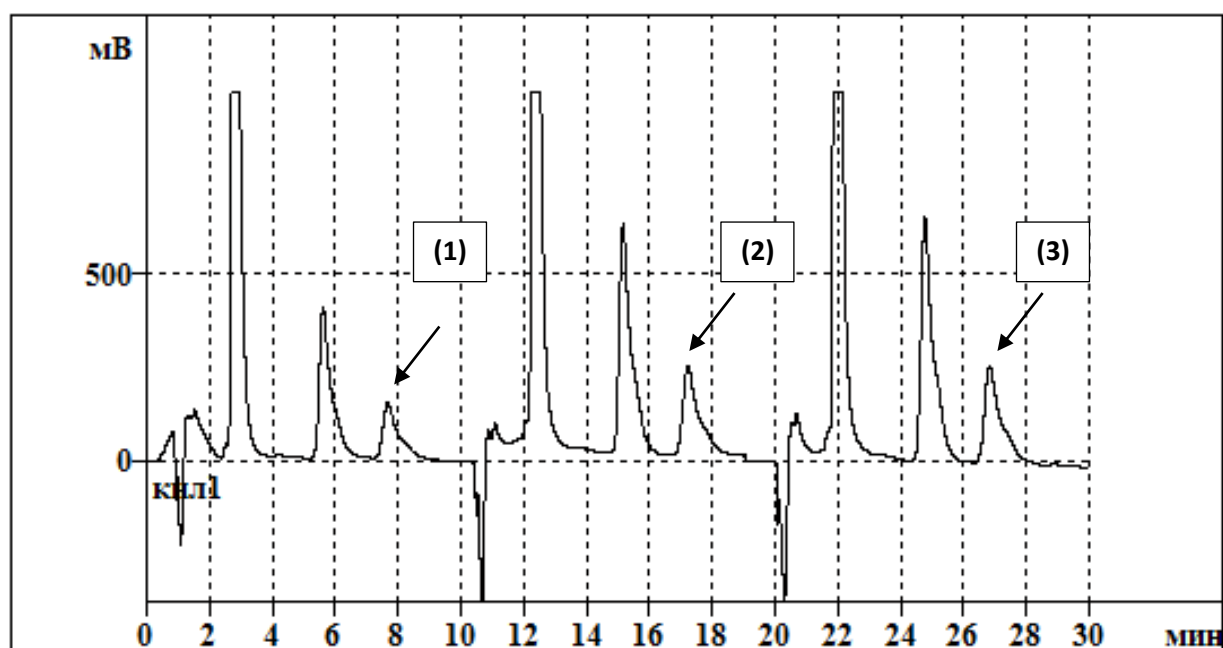


Рисунок 3 – Хроматограмма экстракта головного мозга крысы через 24ч после введения убихинола, разрешение 500пА. Регистрация Коэнзим Q10 после внесения восстановителя (1) – неполное восстановление, (2) и (3) – полное восстановление

2.8. Экспериментальная модель острой фокальной ишемии головного мозга крысы – временная интралюминальная окклюзия филаментом, средней мозговой артерии

Все процедуры проводились в стерильных условиях с соблюдением правил асептики и антисептики.

Наркотизированное животное (хлоралгидрат 300мг/кг, интраперитонеально), фиксировали на подогреваемом столике для постоянного поддержания температуры тела 37⁰С. Для контроля гипертермии температуру измеряли термометром, введенным животному ректально. Шерсть на вентрально-шейной области выбривали, обрабатывали бетадином и спиртом, троекратно от центра к периферии. Под шею подкладывали 5сс шприц для облегчения доступа к общей сонной артерии.

Все хирургические процедуры проводили под операционным микроскопом с высоким разрешением (OLYMPUS, SZ-40, Japan). Хирургическими ножницами рассекали ткани шейной области в районе щитовидной железы справа от срединной линии. Справа под фасцией обнаруживали щитовидную железу, аккуратно отводили ее в сторону, определяли «сонный треугольник», взаимно-пересекающимися 3 мышцами: выше трахеи расположена грудино-подъязычная, наискосок к ней двубрюшная и рядом грудинно-сосцевидная мышца. Мышцы аккуратно раздвигали в стороны исключая травмирование тканей, иммобилизировали ретрактором. Находили бифуркацию общей сонной артерии, которая раздваивается на внешнюю и внутреннюю сонные артерии. Отделяли от спаек и блуждающего нерва, находящегося с латеральная сторона сонной артерии. Коагулировали и перерезали две сосудистые ветви, отходящие от внешней сонной артерии. Ростральную часть внешней сонной артерии плотно перевязывали нитью, как можно ближе к подъязычной кости, другую нить перевязывали, и не затягивали плотно. Устанавливали микрохирургические зажимы на общую сонную артерию (1 см ниже бифуркации) и внутреннюю сонную артерию, таким образом полностью перекрывали кровоток в месте раздвоения артерий. Осуществляли неполный разрез

внешней сонной артерии между двумя нитями, через просвет вводили филамент с силиконовым наконечником (DOCCOL, США) и продолжали двигать его по внешней сонной артерии к общей сонной артерии до микрохирургического зажима, лигатуру затягивали, фиксируя филамент внутри сосуда. Затем полностью разрезали внешнюю сонную артерию, филамент разворачивали и продвигали во внутреннюю сонную артерию до микрохирургического зажима. Клипсу снимали, филамент направляли дальше, во внутреннюю сонную артерию до ощущения сопротивления. Второй зажим удаляли с общей сонной артерии для восстановления кровотока коллатералей [1].

Филамент считался вставленным правильно, а устье средней мозговой артерии перекрыто, если его кончик оставался снаружи, отступая от бифуркации на ширину бранша, примерно 1 см. В протоколе отмечали время начала окклюзии. Далее животное оставляли на 1 час.

Затем филамент извлекали до визуализации его кончика внутри сосуда. Зажимы помещали обратно на внутреннюю и общую сонные артерии. После филамент вынимали, культю плотно затягивали нитью и коагулировали. Зажимы и ретрактор удаляли, ткани ушивали узловым методом послойно. Хирургический шов дезинфицировали спиртовым раствором йода. Для предотвращения обезвоживания внутрибрюшинно вводили 5 мл 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида, подогретого до температуры тела животного (примерно 37С⁰). Животное помещали в отдельную клетку на бумажную подстилку, для предотвращения асфиксии. Наблюдали до выхода из наркоза, перекладывали в индивидуальную клетку с кукурузным подстилом и неограниченным доступом к воде и корму.

2.9. Оценка зоны повреждения головного мозга крыс после проведения фокальной ишемии головного мозга (моделирование инсульта)

2.9.1. Оценка зоны повреждения при помощи окрашивания метаболическим красителем

После проведения эвтаназии и декапитации мозг животного извлекали, помещали в морозилку в чашке Петри при -20°C и оставляли там в течение 10 минут, затем делали 5 поперечных срезов, каждый толщиной около 2 мм.

Зону повреждения головного мозга у крыс оценивали после окрашивания метаболическим красителем 2,3,5 - трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ) через 24 часа (протокол 2) или 4 суток (протокол 3) после проведения фокальной ишемии головного мозга. Замороженный мозг крысы нарезали поперечно, выполняя 5-6 срезов с использованием скальпеля. Первый разрез выполнялся посередине между лобным полюсом и перекрестом зрительных нервов, второй - у перекреста зрительных нервов, третий - у воронкообразной ножки и четвертый - между воронкообразной ножкой и задней долей гипофиза [1].

ТТХ представляет собой жирорастворимое светочувствительное соединение, которое с 1958 года используется для выявления ишемии тканей у млекопитающих. Он остается широко используемым индикатором для оценки ишемии головного мозга. Являясь акцептором протонов пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы в дыхательной цепи, ТТХ подвергается дегидрированию и окрашивает ткани красный цвет в живых тканях. Однако в гипоксической ткани он остается белым из-за отсутствия дегидрирования в результате снижения активности дегидрогеназы.

Срезы мозга помещали в свежеприготовленный раствор ТТХ, накрывали алюминиевой фольгой для защиты от света, оставляли на теплом коврикe при 37°C в течение 15-30 минут, периодически переворачивали для равномерного окрашивания срезов мозга. Срезы фотографировали на документ-камере WolfVision Visualizer VZ-9plus3 и анализировали для определения общей площади

церебральной ишемии в программе ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch of the National Institute of Health).

Для оценки зоны ишемического очага повреждения головного мозга у крысы использовали формулу (Рисунок 4).

$$S_{ish} = S_{kont} - (S_{ipsi} - S_{necr})$$

$$V_{ish} = \sum S_{ish} * d$$

Рисунок 4 – Формула подсчета зоны повреждения при ишемии

S – определяемая площадь; necr – некроз; kont – контралатеральное (здоровое) полушарие; ipsi – ипсилатеральное полушарие; d – ширина сегмента

Представленная выше формула учитывает разницу размеров головного мозга у крыс и размер зоны повреждения мозга выраженном в процентах по отношению к объему поврежденного (ипсилатерального) полушария [1].

Из полученных срезов каждого полушария головного мозга тщательно вырезали светлую неокрашенную часть (область некроза), далее биоматериал замораживали отдельно здоровую (контралатеральную) и поврежденную (ипсилатеральную) стороны при -70°C . В дальнейшем биоматериал использовали для нахождения концентрации коэнзима Q10 в тканях мозга.

2.9.2. Оценка зоны повреждения головного мозга у крысы методом магнитно-резонансной томографии на 1 и 4 сутки

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – неинвазивный, удобный и информативный метод, позволяющий определить динамику очага ишемии у одного и того же животного в различные промежутки времени.

В исследовании измерения проводили на 1 и 4 сутки от момента начала перекрытия средней мозговой артерии. При данном методе исследования можно отследить изменения размеров очага некроза во времени.

Описание метода магнитно-резонансной томографии

Крыс вводили в легкий наркоз с помощью ингаляций 1,5% изофлурана. Помещали на подогреваемый стол в МРТ сканер для мелких животных. Исследования проводились на 7,05 Тл Bruker BioSpec 70/30 USR MR сканере, управляемом консолью ParaVision® 5.1 и оснащенном устройством с амплитудой градиента 105 мТл/м.

T2-взвешенные МРТ-изображения были получены в аксиальной проекции с использованием последовательности импульсов спинового эха RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement – быстрое получение с усилением релаксации) со следующими параметрами сканирования: поле зрения: $2,56 \times 2,56$ см; матрица: 156×156 ; полоса пропускания: 25 000 Гц; TR: 5500 мс; TE: 14,04 мс; TE_{eff}: 56,20 мс; RARE фактор: 8; количество срезов: 20; толщина среза: 0,8 мм; количество средних: 2; общее время сканирования: 3 мин 29 с. Изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ.

20 срезов, снятых на МРТ, вручную обрабатывали в программе ImageJ. Формулу для определения объема очага некроза использовали ту же, что и при морфометрическом методе с окрашиванием ТТХ (см. выше).

2.10. Протоколы исследований

Протокол 1. Изучение фармакокинетики убихинола и убихинона в дозе 30 мг/кг при однократном внутривенном введении

Животных разделяли на 3 группы. Под наркозом (хлоралгидрат 300мг/кг вводили в брюшное пространство) осуществляли постановку катетера в бедренную вену и в зависимости от группы вводили следующие вещества в определенный период времени:

- 1) Группа «Убихинол» (n=5) – раствор убихинола для парентерального введения в дозе 30 мг/кг

- 2) Группа «Убихинон» (n=5) – раствор убихинона для парентерального введения в дозе 30 мг/кг
- 3) Группа «Контроль» (n=5) – физиологический раствор (NaCl 0,9%) в одинаковом объеме вводимых веществ

Пробы плазмы и тканей органов (мозг, печень, почки, левый желудочек сердца) отбирали в группах «Убихинол» и «Убихинон» через 15мин, 2ч, 8ч, 24ч, 48ч, 96ч, 192ч после внутривенного введения препарата, в группе «Контроль» - через 48ч после внутривенного введения физиологического раствора.

Плазму и образцы тканей органов замораживали при -70°C для дальнейшего исследования концентрации коэнзима Q10 в исследуемых образцах методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием.

Протокол 2. Оценка зоны ишемического повреждения головного мозга крыс через 24 часа после создания ишемического инсульта

Животных делили на 6 групп. Всем крысам перед исследованием проводили неврологическое тестирование. Животные, получившие ниже 17 баллов, в исследование не включали.

Под наркозом (хлоралгидрат 300мг/кг, интраперитонеально) крысу фиксировали на подогреваемом столе, проводили окклюзию средней мозговой артерии по модели фокальной ишемии головного мозга по методике, описанной выше, устанавливали катетер в бедренную вену и за 15 мин до восстановления кровотока (реперфузии) вводили исследуемые вещества в зависимости от группы:

- 1) Группа «Убихинол» (n=12) – раствор убихинола для парентерального введения в дозе 30мг/кг
- 2) Группа «Убихинон» (n=12) – раствор убихинона для парентерального введения в дозе 30мг/кг
- 3) Группа «Физ.раствор» (n=12) – физиологический раствор (NaCl 0,9%) в равном объеме вводимых веществ
- 4) Группа «Растворитель» (n=12) – раствор без активного вещества для парентерального введения

5) Группа «Ложнооперированные» (n=11) – животным проводили все манипуляции кроме перекрытия средней мозговой артерии.

6) Группа «Интактные» (n=5) – животным не проводили никаких манипуляций.

Пробы плазмы и головной мозг крысы отбирали через сутки. Плазму замораживали при температуре -70°C для дальнейшего исследования ВЭЖХ методом. Срезы головной мозга окрашивали метаболическим красителем ТТХ.

Протокол 3. Определение размера зоны ишемического повреждения головного мозга крыс на 1 и 4 сутки на модели внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии методом МРТ

Крыс делили на 2 группы. Всем крысам перед вхождением в эксперимент проводили неврологическое тестирование. Животные, получившие ниже 17 баллов, в исследование не включали.

Вводили наркоз (хлоралгидрат 300мг/кг, интраперитонеально), далее фиксировали на подогреваемом столе, проводили окклюзию средней мозговой артерии по методике, описанной выше, устанавливали катетер в бедренную вену и за 15 мин до восстановления кровотока вводили исследуемые вещества в зависимости от группы:

- 1) Группа «Убихинол» (n=4) – раствор убихинола для парентерального введения в дозе 30мг/кг
- 2) Группа «Растворитель» (n=5) – растворитель для парентерального введения (без действующего вещества)

По истечении суток с момента окклюзии средней мозговой артерии сразу перед МРТ сканированием, по методу описанному выше, проводили неврологическое исследование. На четвертые сутки, после окклюзии средней мозговой артерии, повторно проводили неврологическое исследование до МРТ-сканирования.

Сразу после сканирования, животным проводили эвтаназию, мозг извлекали, срезы окрашивали ТТХ, фотографировали для дальнейшего расчета объема ишемического повреждения, далее замораживали для последующего определения

концентрации коэнзима Q10. Плазму собирали и замораживали при температуре – 70°C для дальнейшего исследования методом ВЭЖХ анализа.

2.11. Статистические методы анализа полученных результатов

Полученные в ходе эксперимента данные статистически обрабатывали с помощью компьютерных STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel. Непараметрический U-критерия Манна-Уитни использовали для сравнения данных показателей исследуемых результатов между группами. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение и среднего значения \pm стандартная ошибка, (ср.знач - среднее арифметическое значение показателя для группы, станд.отклон – стандартное отклонение, станд.ош.– стандартная ошибка среднего). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Сравнения между группами были выполнены с использованием программы Soft Statistic 8.0. Для сравнения внутри группы использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым [1].

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ УБИХИНОЛА И УБИХИНОНА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ, ИМЕЮЩИХ ОДИНАКОВЫЙ СОСТАВ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Изучение фармакокинетики субстанций в новых лекарственных формах позволяет наиболее полно оценить процессы всасывания, распределения препарата по органам и тканям, метаболизма и выведения. В данной диссертационной работе использовались дозы и протоколы, разработанные на основании исследований, проведенных научным коллективом кафедры в предыдущие годы.

3.1. Обоснование временных интервалов и дозировок исследуемых препаратов

Ранее было проведено фармакокинетическое исследование 1% раствора солюбилизованного убихинола для парентерального введения в дозировках от 5 до 20 мг/кг и временном интервале до 48 часов [16]. В результате исследования после инъекции препарата выявили быстрое, достоверное и пролонгированное повышение уровней коэнзима Q10 в тканях головного мозга и других органов, что позволяет продолжить изучение исследуемых веществ с использованием других дозировок и временных интервалов.

В исследовании эффективности внутривенного введения препарата 3% раствора Кудесана (ОАО «Rusfic», Россия) (солюбилизованный убихинон для внутреннего применения) в дозировке 30 мг/кг в условиях моделирования ишемического инсульта был продемонстрирован выраженный нейропротекторный эффект убихинона [81].

В настоящем исследовании впервые проведено сравнение фармакокинетики и эффективности препаратов убихинола и убихинона для внутривенного введения, имеющих одинаковый состав вспомогательных веществ. При этом их доза

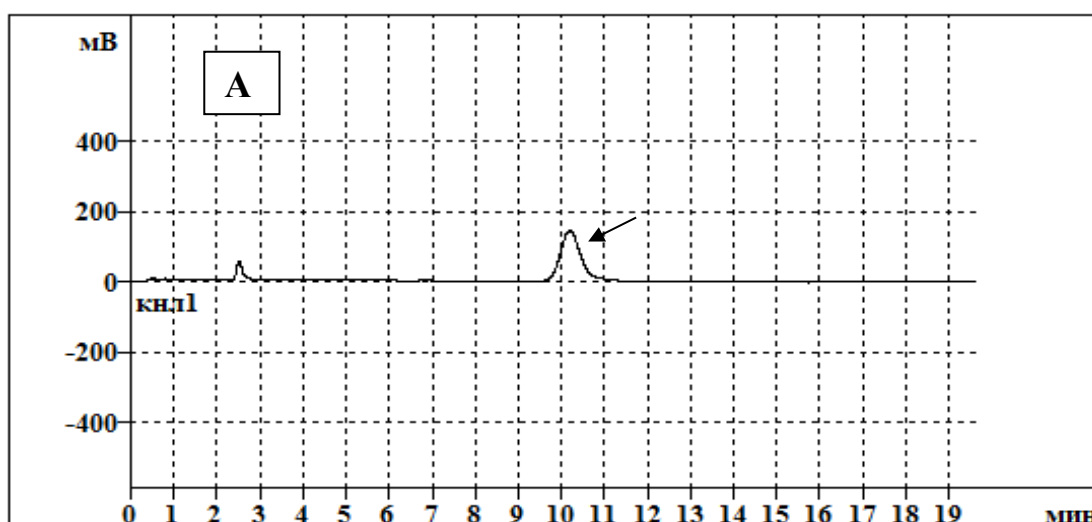
составила 30 мг/кг, а временные интервалы были расширены и составили 15 мин, 2ч, 24ч, 48ч, 96ч, 192ч.

3.2. Уровни CoQ10 в плазме

Плазменные концентрации после внутривенного введения 30мг/кг убихинона и убихинола оставались достоверно высокими на протяжении всего исследуемого периода, превышая исходные концентрации в плазме крови.

Кинетические кривые исследуемых препаратов соответствовали двухфазной фармакокинетике. При введении убихинона продолжительность быстрой (первой) фазы составила 8ч, при введении убихинола - 24 ч.

Скорость снижения концентраций в плазме для двух препаратов в течение первых 8 ч после инъекции не различалась. В интервале 8ч-96ч концентрации убихинона достоверно превышали концентрации убихинола, выравниваясь к 192ч (Рисунок 5).



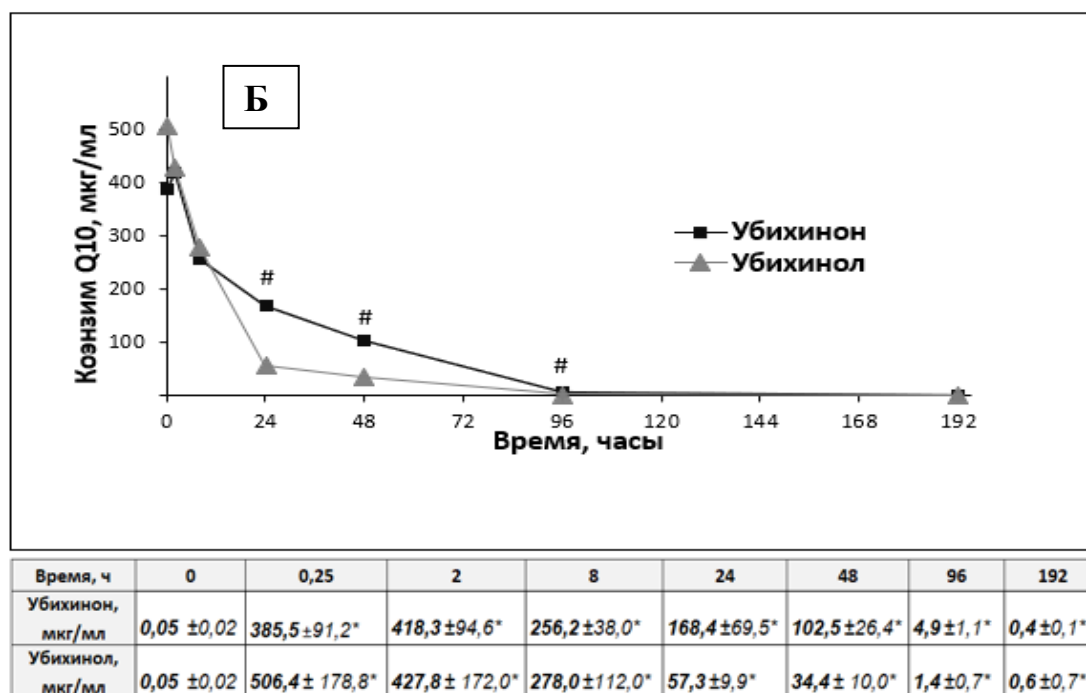


Рисунок 5 – Хроматограмма экстракта плазмы, отобранной через 8ч после внутривенного введения убихинола, разрешение 20Ua; ← – пик CoQ10 (А); Концентрация коэнзима Q10 в плазме крови у крысы в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола и убихинона в концентрации 30 мг/кг; * – $p < 0,01$ по сравнению с точкой “0”; # – $p < 0,01$ убихинол по сравнению с убихиноном (Б) [26, 27, 144]

3.3. Тканевое распределение коэнзима Q10

Головной мозг

После инъекций убихинона и убихинола распределение коэнзима Q10 было идентичным в обеих группах, наблюдали быстрый прирост его содержания в тканях органов. В энергозатратных органах, таких как сердце, головной мозг, почки и печень концентрация коэнзима длительное время оставалась достоверно повышенной, постепенно снижаясь в интервале 4-8сут. Концентрация коэнзима Q10 в головном мозге в обеих группах достоверно увеличивалась уже через 15мин (0,25ч) и была почти в 2 раза выше значений контрольной группы. На протяжении не менее чем 2суток концентрация коэнзима оставалась повышенной на 50-70% в сравнении с контролем, далее постепенно снижалась и к 8 суткам уже не отличалась от концентрации фоновых значений (Рисунок 6).

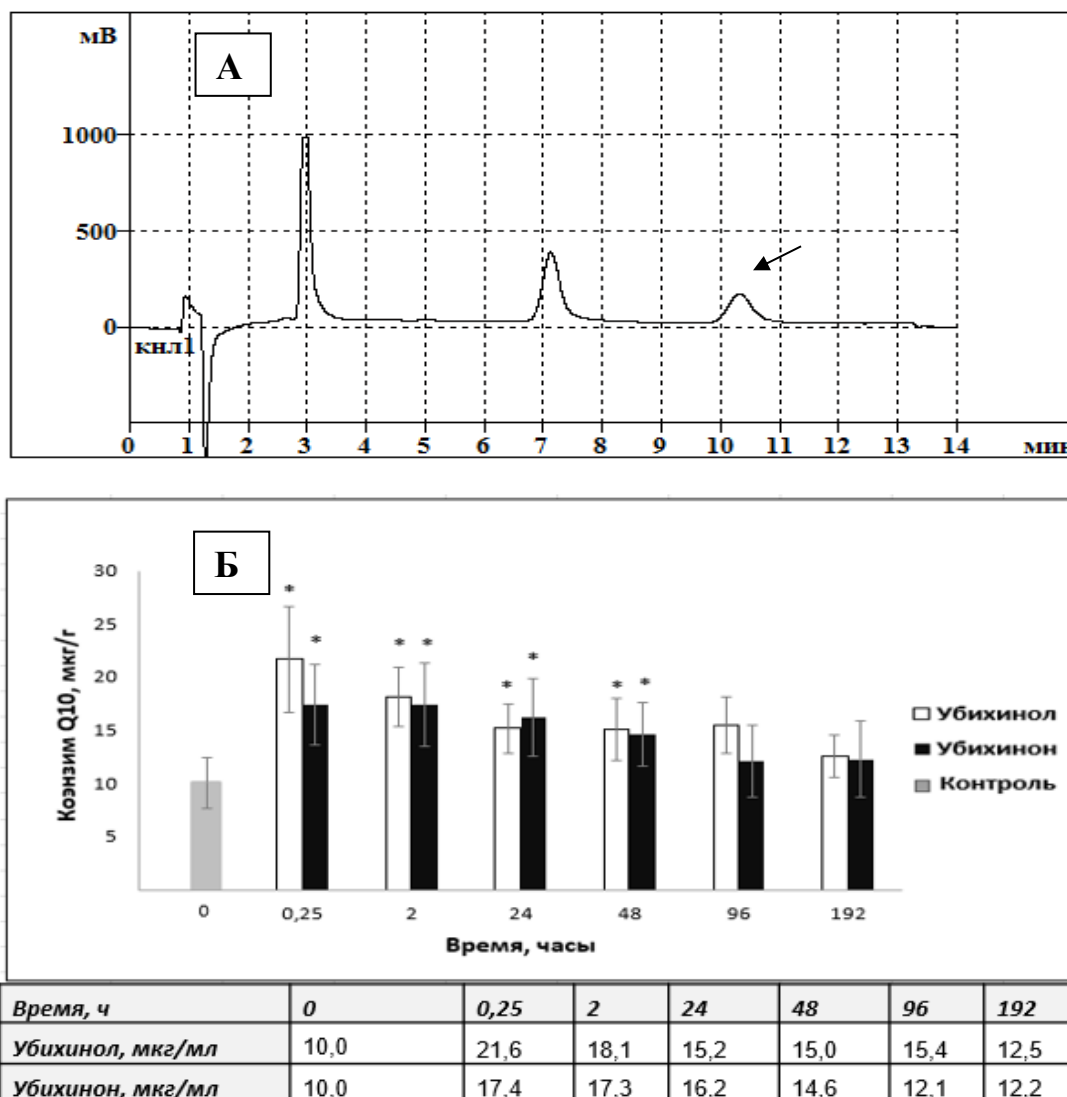
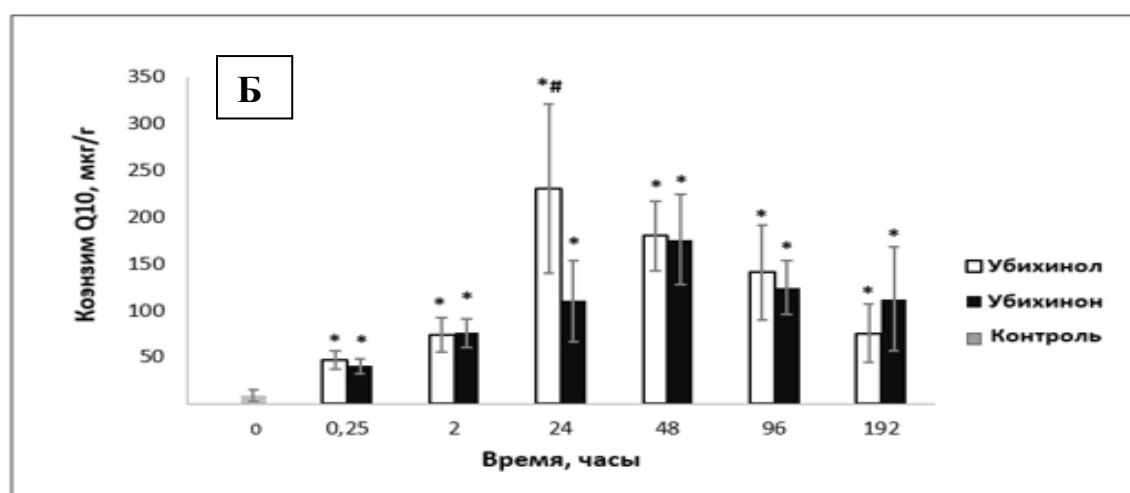
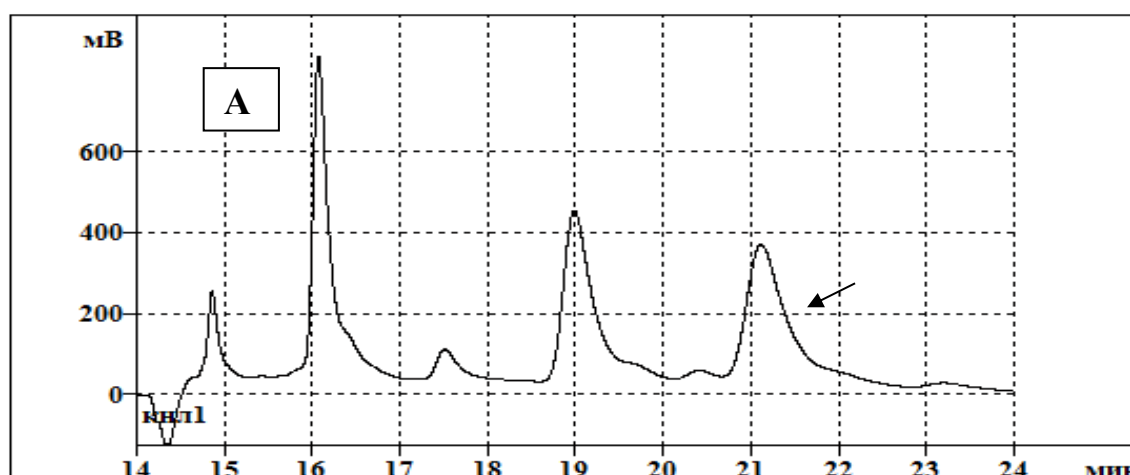


Рисунок 6 – Хроматограмма экстракта ткани головного мозга крысы, отобранной через 8ч после введения препаратов коэнзима Q10, разрешение 200nA; \blacktriangleleft – пик коэнзима Q10. (б) Тканевые уровни коэнзима Q10 в головном мозге крысы в течение 8 суток после внутривенного введения убихинола и убихинона в концентрации 30 мг/кг; * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # – $p < 0,05$ убихинол по сравнению с убихиноном

Печень

В печени к первым суткам после внутривенного введения убихинола постепенное накопление коэнзима Q10 достигало максимума на уровне, который в 17-23 раза превышал фоновые значения. После введения убихинона увеличение уровней коэнзима Q10 происходило к 2 суткам, при этом достигнутое содержание достоверно не отличалось от такового после введения убихинола. К 8 суткам в

обеих группах концентрации снижались незначительно и оставались повышенными, в 7-10 раз превосходя фоновые значения (Рисунок 7).



Время, ч	0	0,25	2	24	48	96	192
Убихинол, мкг/мл	9,3	47,5	73,8	230,4	180,2	141,0	75,7
Убихинон, мкг/мл	9,3	40,6	75,9	110,1	175,7	124,4	112,1

Рисунок 7 – Хроматограмма экстракта ткани печени, отобранной через 1 сутки после введения препаратов коэнзима Q10, разрешение 500nA; \blacktriangleleft – пик коэнзима Q10 (A); Тканевые уровни коэнзима Q10 в печени крысы в течение 8 суток после внутривенного введения убихинола и убихинона в концентрации 30 мг/кг; * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # – $p < 0,05$ убихинол по сравнению с убихиноном (Б)

Левый желудочек сердца

После внутривенного введения убихинола и убихинона уровни коэнзима в сердце уже через 15 мин были в 2.5раза выше по сравнению с контрольной группой и оставались повышенными на протяжении не менее 2ч. Содержание коэнзима Q10 в сердечной мышце превышало фоновые уровни как минимум в течение 96ч после введения препаратов (Рисунок 8).

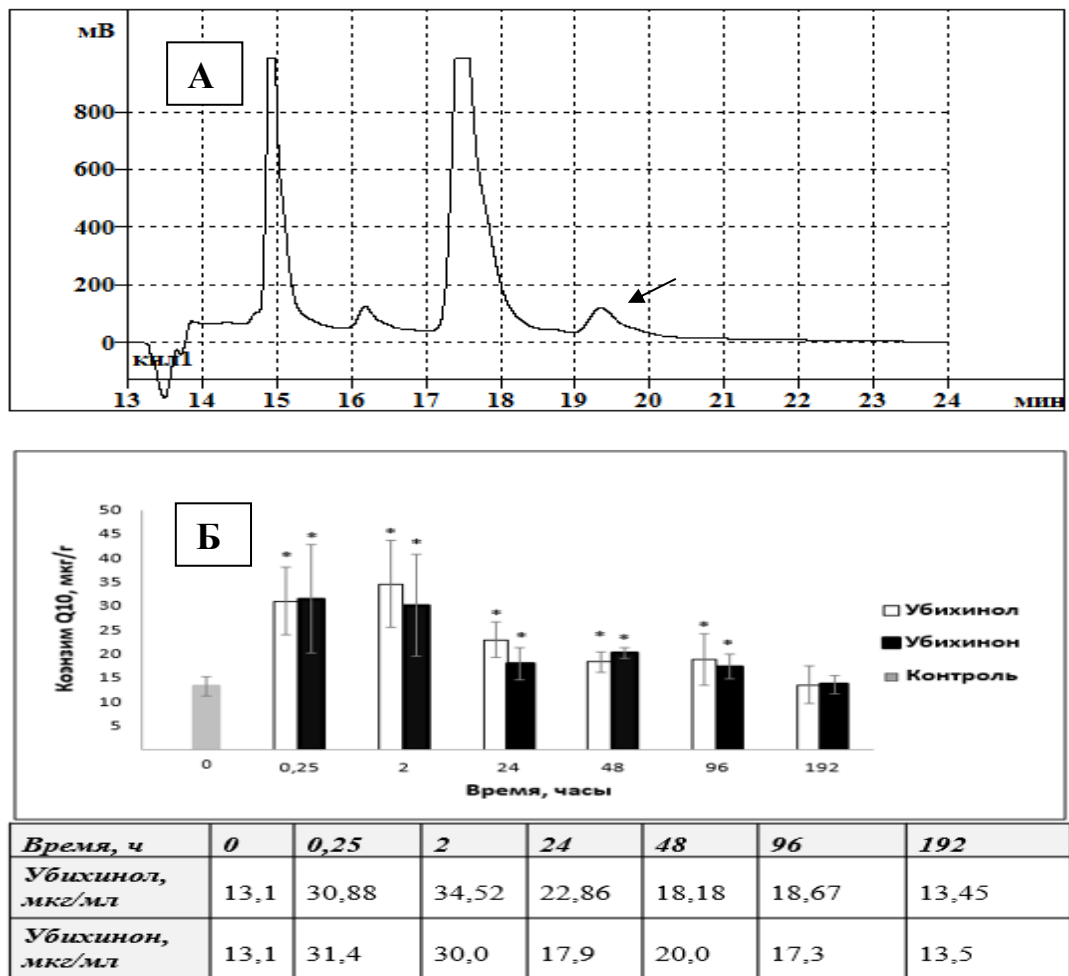


Рисунок 8 – Хроматограмма экстракта ткани левого желудочка, отобранной через 1 сутки после введения препаратов коэнзима Q10, разрешение 500nA; ▲ – пик коэнзима Q10 (А); Тканевые уровни коэнзима Q10 в левом желудочке сердца крысы в течение 8 суток после внутривенного введения убихинола и убихинона в концентрации 30 мг/кг; * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # – $p < 0,05$ убихинол по сравнению с убихиноном (Б)

Почки

После введения препаратов через 15 мин уровни коэнзима Q10 в почках превышали значения по сравнению с контрольной группой в 3.5 раза, постепенно снижались к 8 суткам, оставаясь достоверно повышенными на протяжении 96ч (Рисунок 9).

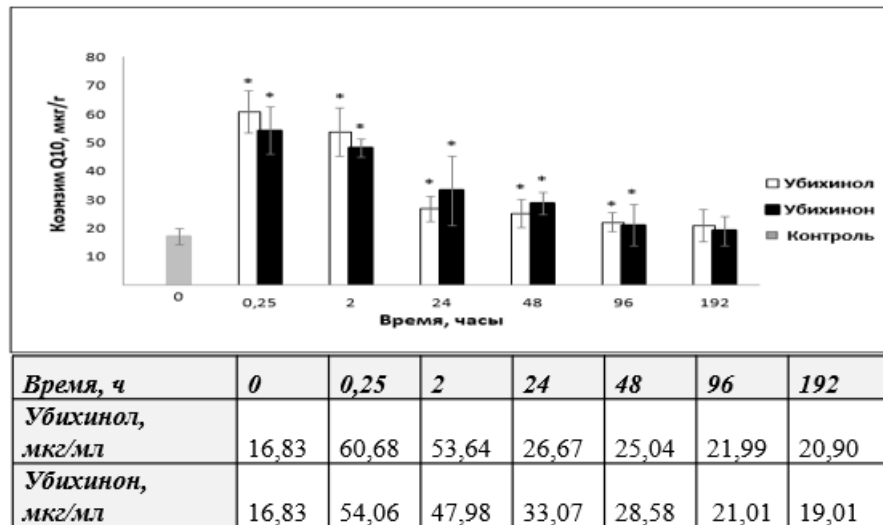


Рисунок 9 – Тканевые уровни коэнзима Q10 в почках крысы в течение 8 суток после внутривенного введения убихинола и убихинона в концентрации 30 мг/кг; * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # – $p < 0,05$ убихинол по сравнению с убихиноном

3.4. Оценка тканевой биодоступности убихинола и убихинона, введенных внутривенно

Рассчитанные значения $AUC_{0 \rightarrow 192 \text{ ч}}$ и значения общего клиренса для плазмы представлены в таблице. После введения каждого из исследуемых веществ проводили оценку тканевой биодоступности в органах по величине AUC , периоды повышенных концентраций для сердца, почек и мозга соответствовали 96ч, для печени 192ч [26,27] (Таблица 3).

Таблица 3 – Относительная тканевая биодоступность убихинола в сравнении с убихиноном при внутривенном введении равных доз

Ткани	Убихинол	Убихинон	Отн.биодоступность (убихинол vs убихинон, %)
Плазма <i>AUC</i> ₀₋₁₉₂ , МГ/МЛ*Ч <i>Cl_t</i> , МЛ/Ч/КГ	7,64 3,95	11,88 2,52	64% 157%
Миокард ЛЖ <i>AUC</i> ₀₋₉₆ , МГ/МЛ*Ч	2,07	1,94	107%
Мозг <i>AUC</i> ₀₋₉₆ , МГ/МЛ*Ч	1,50	1,41	106%
Почки <i>AUC</i> ₀₋₉₆ , МГ/МЛ*Ч	2,74	2,92	94%
Печень <i>AUC</i> ₀₋₁₉₂ , МГ/МЛ*Ч	26,49	24,14	110%

3.5. Характеристики тканевого распределения коэнзима Q10 после внутривенного введения крысам убихинола и убихинона

В результате внутривенного введения высокие концентрации коэнзима Q10 в плазме постепенно снижаются на протяжении первых суток после введения убихинола и в течение 48ч после введения убихинона, при этом в обоих случаях наблюдается увеличение концентрации в печени в этот же период. Полученные результаты демонстрируют, что коэнзим Q10 накапливается в печени с дальнейшим постепенным высвобождением в кровь. Попавшее в печень общее количество коэнзима Q10 (оцененное по величине *AUC*) у двух препаратов практически одинаково и не зависит от редокс-формы введенного вещества. Накопление в печени также свидетельствует, что основной путь экскреции коэнзима Q10 – секрция в желчь. Сравнение полученных данных показывает, что

убихинол быстрее, чем убихинон, уходит из плазмы крови и раньше достигает максимальных значений в печени (Рисунок 10).

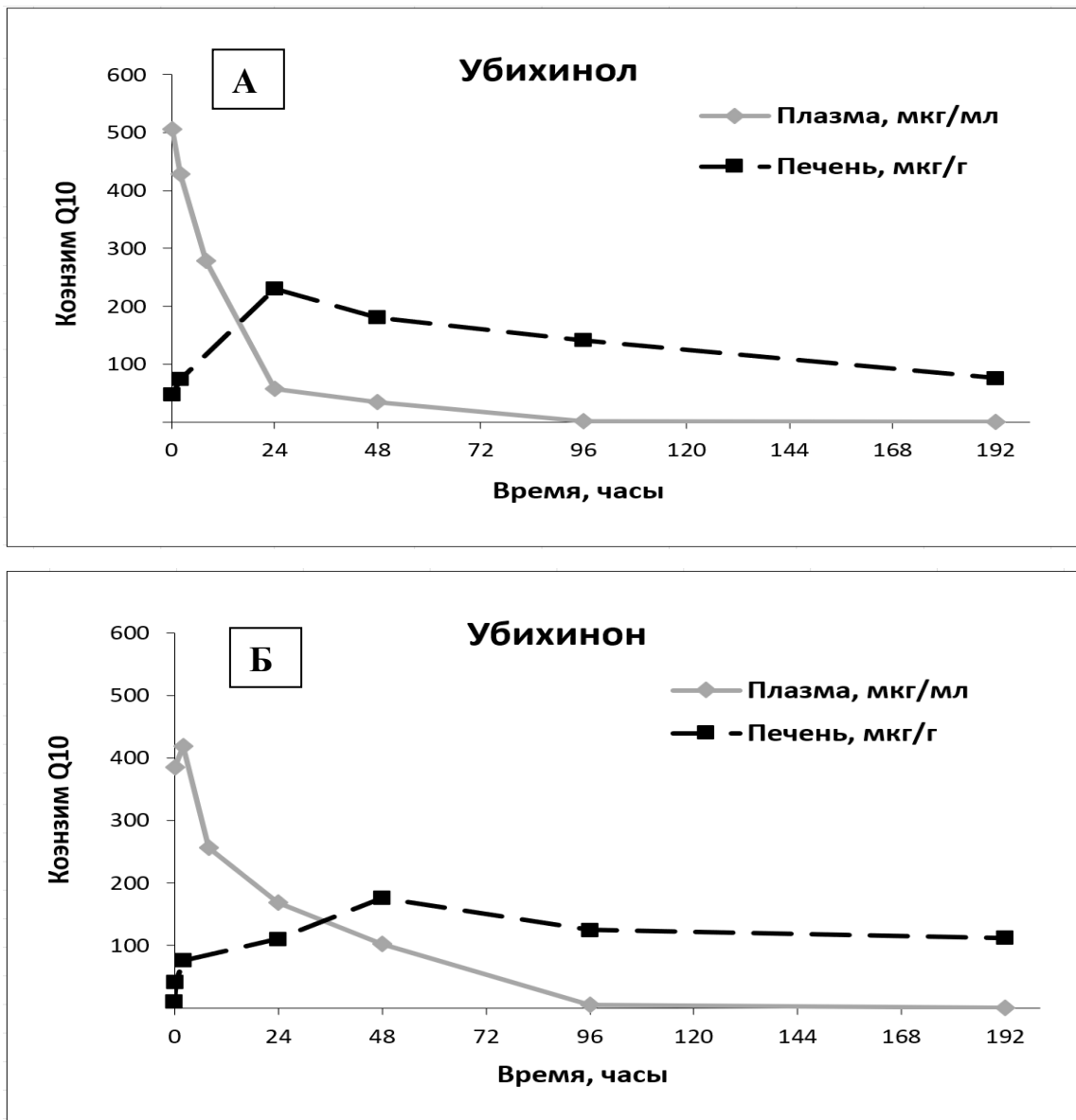


Рисунок 10 – Сопоставление кинетических профилей коэнзима Q10 в плазме и печени у крыс после внутривенного введения убихинола (А) и убихинона (Б)

На сегодняшний день фармакокинетические исследования убихинола и убихинона опубликованы только для пероральных форм [75], сравнение фармакокинетики двух внутривенных форм проведено впервые.

Ранее фармакокинетическое исследование убихинола в дозировке 10 мг/кг [16] показало схожие кинетические характеристики, с ожидаемо более низкими концентрациями для органов. Известно, что в крови более 90% эндогенного

коэнзима Q10 находится в восстановленной форме. В исследовании Калениковой Е.И. с соавт. было обнаружено, что после внутривенного введения окисленной формы коэнзима Q10 почти полное его восстановление в крови до убихинола занимает около суток [68]. Наши результаты показали, что убихинол быстрее и успешнее экстрагируется печенью, именно с этим связано более медленное и позднее достижение максимальных уровней коэнзима Q10 в печени после введения убихинона. Данные позволяют предположить, что внутривенное введение именно убихинола может ускорить и наступление эффекта за счет одномоментного создания высоких уровней эффективного антиоксиданта в крови и тканях [26,27].

Выводы по главе

1. Впервые проведено сравнение фармакокинетики введенных внутривенно препаратов окисленного и восстановленного коэнзима Q10 в дозировке 30 мг/кг, одинаковых по составу вспомогательных веществ. Показано, что, несмотря на различия в величине общего клиренса, пополнение тканевого содержания коэнзима Q10 в отдельных органах происходит одинаково успешно.
2. Быстрый подъем тканевых уровней и их долговременное сохранение дает основание для изучения эффективности внутривенных лекарственных форм коэнзима Q10 в ургентной терапии.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ УБИХИНОЛА И УБИХИНОНА ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ В ОСТРОЙ СТАДИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПО КРИТЕРИЯМ ВЫЖИВАЕМОСТИ, НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА, РАЗМЕРА ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ КОЭНЗИМА Q10 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ОТ НАЧАЛА ИШЕМИИ

4.1. Выживаемость

Животные, погибшие во время операции или в течение 2 ч после выхода из наркоза, не включались в итоговый расчет летальности, их смерть принимали за осложнения операции.

Смертность в группах «Физ.раствора» и «Растворителя» была одинаковой и составила 43% (погибло 9 животных из 21) и 41% (погибло 7 из 17) соответственно. У ложнооперированных животных окклюзия общей сонной артерии на 60 мин не приводила к ишемии головного мозга, т.к. компенсировалась за счет коллатерального кровотока, поэтому ни летальных исходов, ни неврологического дефицита в этой группе зарегистрировано не было. В группе «Убихинона» смертность была минимальной (8%: погибло 1 из 12 животных) и значительно ниже по сравнению с группами «Физ.раствор» и «Растворитель», $p < 0,01$. Внутривенное введение убихинола повышало выживаемость до 100% — ни одна из 12 оперированных крыс не погибла к концу 1-х суток после перекрытия средней мозговой артерии [80, 111].

4.2. Неврологический статус

Фокальная ишемия головного мозга привела к формированию неврологического дефицита. При регистрации по шкале mNSS выявляли в основном двигательный дефицит (пробы 1–4), но регистрировали и сенсорный дефицит (пробы 5,6). У ложнооперированных животных неврологического дефицита не наблюдали; средний балл составил $17,7 \pm 1,3$. Суммарный балл в группах «Физ. раствор» и «Растворитель» достоверно снизился ($p < 0,01$) и составил $7,4 \pm 2,3$ и $7,1 \pm 1,6$ соответственно. В группе с внутривенным введением убихинона и убихинола неврологический статус животных был достоверно выше, чем в контрольных группах и составил $10,6 \pm 2,1$ и $11,2 \pm 1,2$ соответственно, $p < 0,05$. Однако существенных различий между группами «Убихинол» и «Убихинон» не было, $p = 0,4$ (Рисунок 11).

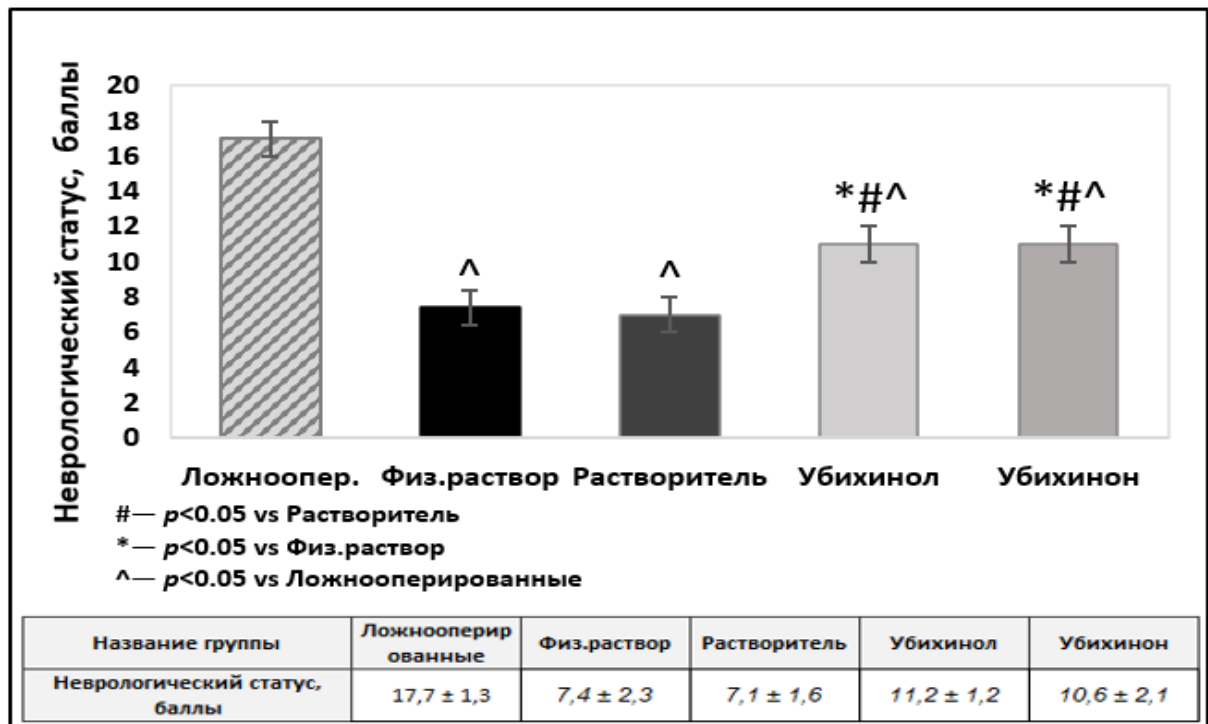


Рисунок 11 – Неврологический статус по шкале mNSS через 24 ч после окклюзии среднемозговой артерии. Группы: Растворитель, Физ.раствор, Убихинол, Убихинон, Ложнооперированные

4.3. Размер зоны ишемического повреждения после окклюзии средней мозговой артерии через 24ч

Фокальная ишемия головного мозга приводила к формированию зоны повреждения в результате гибели нейронов, после наступления ишемии в течение 60 мин. Вокруг зоны необратимой гибели нейронов - ядра некроза, находится зона ишемической полутени – пенумбры, где клетки живы и находятся в состоянии обратимой гипоксии.

Через 24ч зона некроза (по отношению к ипсилатеральному полушарию) в группе «Растворитель» ($31,3 \pm 9\%$) была сопоставима с группой «Физ.раствор» ($32,2 \pm 13,4\%$), $p = 0,9$. После внутривенного введения 1% растворов убихинола и убихинона наблюдали ограничение зоны некроза, что отражает бо́льшую устойчивость тканей мозга к ишемии (Рисунок 12).

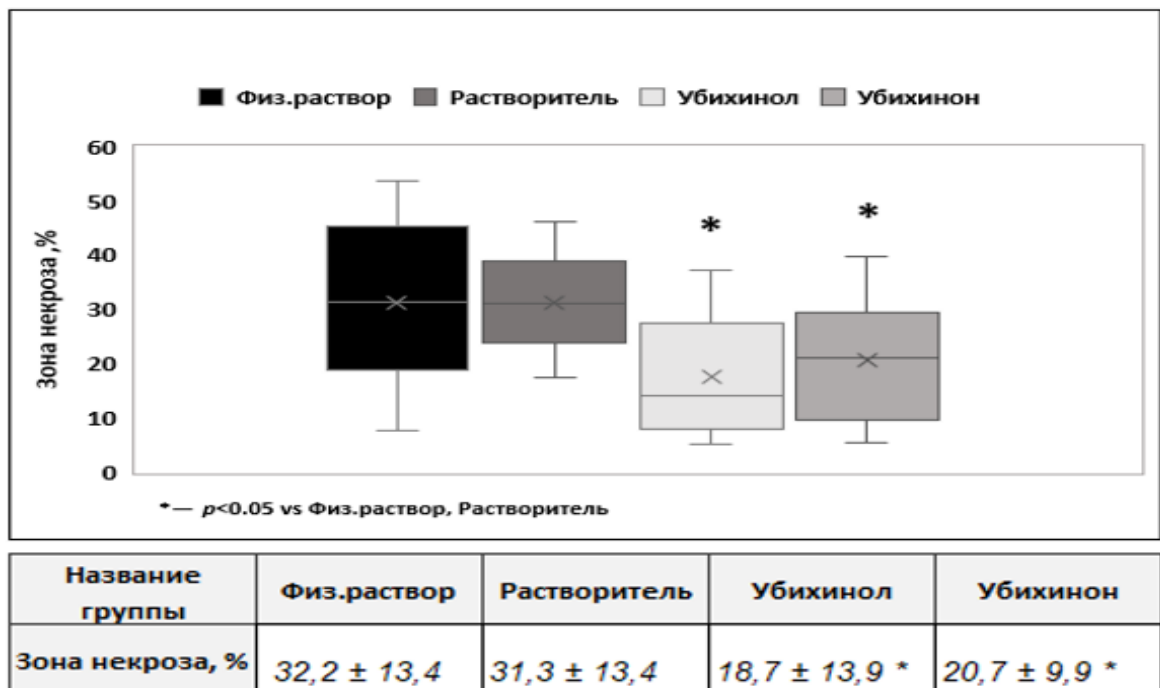


Рисунок 12 – Размер зоны некроза в результате ишемического повреждения через 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Физ.раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон

В группе «Убихинол» зона некроза составила $18,7 \pm 13,9\%$, что было ниже, в сравнении с группами «Физ. раствор» и «Растворитель», $p < 0,05$. В группе

«Убихинон» ($20,7 \pm 9,9\%$) также наблюдалось уменьшение площади некроза, $p < 0,05$.

В то же время, между группами животных, получавшими однократно внутривенно убихинон или убихинол, не выявлены статистически значимые различия, $p = 0,5$ (Рисунок 11).

4.4. Содержание коэнзима Q10 в головном мозге крыс после окклюзии средней мозговой артерии через 24 часа

Определение концентрации коэнзима Q10 в тканях головного мозга крыс с инсультом проводили в предварительно собранном биоматериале полушарий головного мозга где была исключена зона некроза (использовали только живую ткань, со сохраненной функцией клеток). В группах «Интактных» и «Ложнооперированных» достоверных различий содержания коэнзима Q10 между полушариями мозга (внутри групп) и между группами не было, уровни составили $20,1 \pm 1,7$ мкг/г и $21,7 \pm 1,2$ мкг/г соответственно, $p = 0,7$. В группах «Физ.раствор» и «Растворитель» достоверное снижение уровня эндогенного коэнзима Q10 наблюдали в обоих полушариях мозга. В ипсилатеральном полушарии, где формируется зона ядра некроза, концентрация коэнзима Q10 была снижена на 27% и 21% по сравнению с интактными крысами, $p < 0,05$. Внутри группы также было установлено достоверное снижение концентрации в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контралатеральным полушарием ($19,7 \pm 1,4$ мкг/г), $p < 0,05$.

Несмотря на отсутствие ишемического повреждения в контралатеральном полушарии, в нем также наблюдали снижение концентрации эндогенного коэнзима Q10 (в группе «Физ.раствор» на 22%, $p < 0,05$).

Однократное внутривенное введение 1% солюбилизированного раствора убихинола восстанавливало уровни коэнзима Q10 в тканях мозга обоих полушарий до значений интактных животных. В ипсилатеральном полушарии концентрация коэнзима Q10 составляла $20,4 \pm 4,4$ мкг/г, а в контралатеральном полушарии $22,6 \pm$

5,5 мкг/г. Убихинон, введенный в той же концентрации, восстанавливал уровни коэнзима Q10 в обоих полушариях наравне с убихинолом: до $25,2 \pm 7,5$ мкг/г в контралатеральном и $22,8 \pm 4,3$ мкг/г в ипсилатеральном полушариях. Тенденция к большему накоплению коэнзима Q10 в мозге животных, получавших внутривенное введение убихинона, не была достоверной, $p = 0,07$ (Рисунок 13).

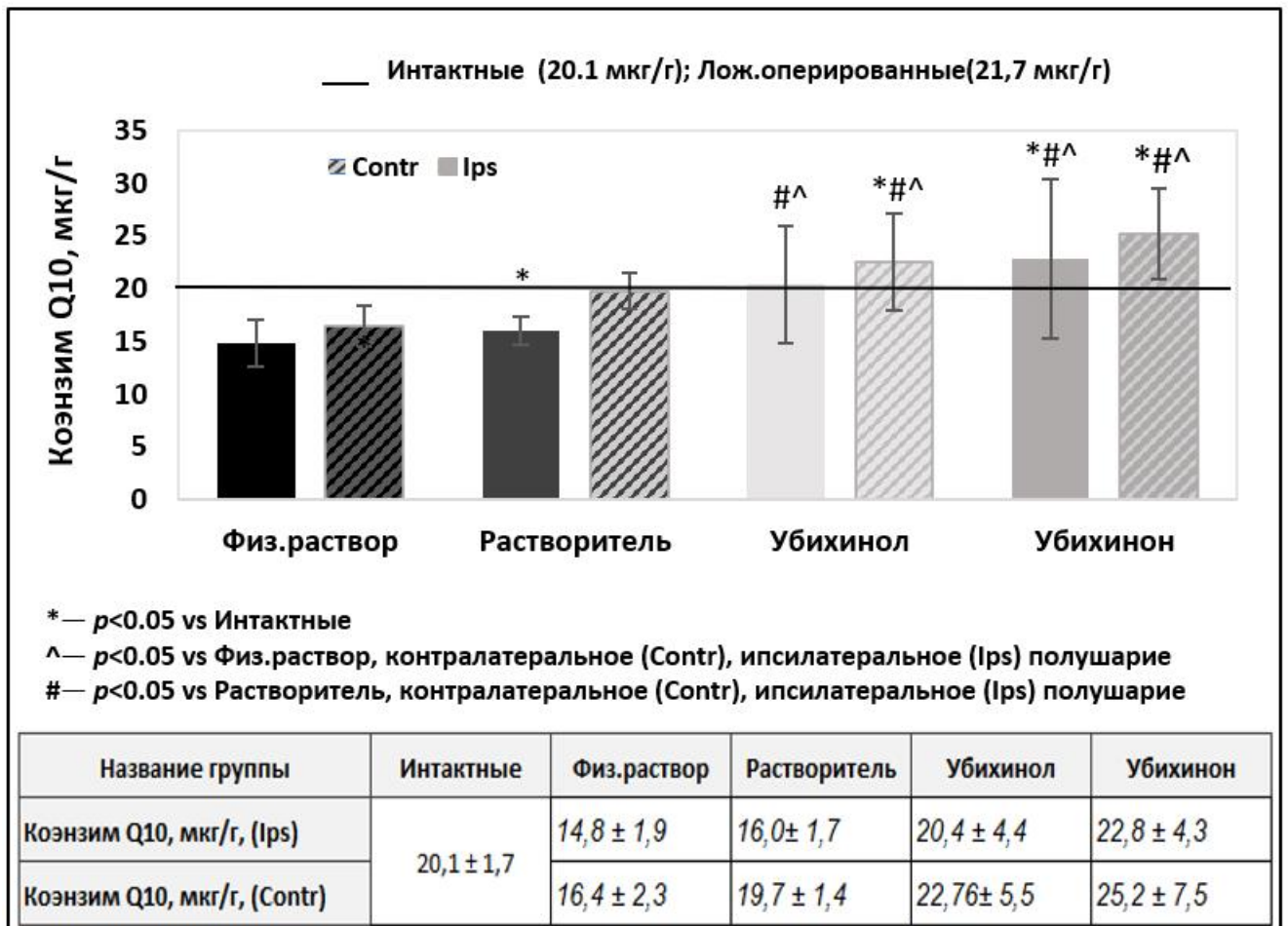


Рисунок 13 – Концентрация коэнзима Q10 в головном мозге через 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Физ.раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон. Contr – контралатеральное полушарие; Ips — ипсилатеральное полушарие. Горизонтальная линия — концентрация коэнзима Q10 в интактной группе

Обсуждение

Ишемическое повреждение головного мозга вызывает дефицит кислорода вокруг и внутри ядра ишемии и ряд метаболических нарушений в тканях за счет недостатка питательных веществ и накопления продуктов распада, токсичных для тканей мозга. В области ишемии запускается каскад реакций, включающий активацию анаэробного гликолиза, развитие лактоацидоза и цитотоксического отека клеток [80]. Усиление тяжести ишемии приводит к уменьшению производства АТФ и ограничению нормальной работы ионных каналов, активации процессов некроза и апоптоза. Ядро ишемии – зона, где очень рано наступают необратимые изменения, уже через 10 мин от начала полного перекрытия кровотока.

В течение около 3 и до 6 ч эта зона остается окруженной ишемической полутенью, в тканях которой могут происходить обратные, направленные на восстановление процессы. Образование большей зоны ядра инфаркта головного мозга происходит уже в первые 5 ч после начала ишемии. Процессы, которые начались с первых минут повреждения после начала ишемии, определяют тяжесть дальнейшего поражения головного мозга. Лактоацидоз, кальциевая эксайтотоксичность, окислительный стресс и запущенные каскады апоптоза продолжают развиваться до 24 ч и могут привести к увеличению площади поражения в отдаленном периоде до 7 сут. Затем преобладает регрессивный процесс с образованием мозговых кист и глиального рубца. Своевременное восстановление кровотока на фоне спонтанной реканализации или при лечении фибринолитическими препаратами дает наилучший лечебный эффект во время острой церебральной ишемии, однако сама реперфузия вносит дополнительный вклад в поражение головного мозга. Это называется реперфузионным синдромом или кислородным парадоксом. В условиях гипоксии в клетках накапливается много восстановленных компонентов митохондриальной дыхательной цепи [80]. При реперфузии (реканализации сосудистого русла), происходит мощное поступление кислорода в эти зоны и индуцируется окислительный стресс – образуется много

высокоактивных свободных радикалов, это называется реперфузионным синдромом [1]. Увеличение площади поражения головного мозга происходит именно за счет полутени. Ишемическая полутень является мишенью для нейропротекторных препаратов, поскольку содержит ткани с функциональными и потенциально обратимыми повреждениями [107].

Экспериментальная модель обратимой ишемии средней мозговой артерии является достаточно травматичной моделью инсульта и приводит к формированию обширной площади поражения в бассейне средней мозговой артерии, и максимально приближена к клиническим условиям, где разрушительное воздействие на мозг после возникновения тромба, сменяется спонтанной реканализацией или после введения тромболитических препаратов при лечении инсульта.

В предыдущих экспериментальных исследованиях был доказан и защищен патентом нейропротекторный эффект убихинона, введенного внутривенно однократно после начала ишемии в дозе 30мг/кг в составе препарата Кудесан (Приложение Б) [81].

В текущем исследовании основным объектом изучения является новая инновационная форма убихинола для внутривенного введения. Известно, что именно восстановленный коэнзим Q10, убихинол, проявляет антиоксидантную активность. Хотя существует баланс между окисленным и восстановленным коэнзимом Q10 в организме в каждой ткани, именно убихинол наиболее эффективен в снижении окислительного стресса [80]. В нашем исследовании изучалась новая форма убихинола для парентерального введения. Для сравнения использовали такую же лекарственную форму убихинона с аналогичным составом вспомогательных веществ. Результаты исследования доказали, что сам растворитель значимо не влияет на размер повреждения. Таким образом, мы имели возможность оценить и сравнить защитный эффект именно от введения коэнзима Q10 в разных редокс-формах, который обусловлен исключительно действием активного вещества — убихинола или убихинона.

В исследовании Белоусовой М. на модели временной окклюзии средней мозговой артерии по методу Лонга, коэнзим Q10 (окисленный) вводили животным внутривенно через 45мин после начала окклюзии средней мозговой артерии. Состояние животных оценивали через 24ч.

Данные, полученные в ходе исследования, показали, что в группе животных, которым вводили коэнзим Q10, наблюдали ограничение зоны некроза на 67% меньше по сравнению с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор, накопление коэнзима Q10 в тканях головного мозга у крыс в том числе в ипсилатеральном полушарии достоверно выше по сравнению с контрольной группой и интактными животными, снижение неврологического дефицита и увеличение выживаемости по сравнению с контрольной группой [1,15].

В текущем исследовании вводили убихинол и убихинон в дозе 30мг/кг внутривенно в составе запатентованных солюбилизированных растворов для парентерального введения.

В группе «Убихинола» наблюдали уменьшение зоны некроза по сравнению с группой, которой вводили физиологический раствор или растворитель. Незначительная разница в размере повреждения между группами «Физ.раствора» и «Растворителя» может быть из-за наличия аскорбиновой кислоты в составе растворителя (плацебо). Однако, по результатам видно, что аскорбиновая кислота в препарате не способствует ограничению зоны некроза.

В состав солюбилизированных форм убихинола и убихинона для парентерального введения входит кремофор, улучшающий стабильность и растворимость действующих веществ. Это вещество достаточно токсичное для клеток организма животного. Однако, несмотря на наличие кремофора, содержащий его препарат убихинола достоверно, почти в 1,7 раз ограничивал размер очага ишемического повреждения у животных по сравнению с контрольной группой.

Содержание коэнзима Q10 в ипсилатеральном полушарии у крыс после проведения окклюзии средней мозговой артерии было значительно ниже и составляло 27% и 21% в обеих контрольных группах (Физ.раствор; Растворитель).

Несмотря на отсутствие некроза и ишемии в контралатеральном полушарии, в нем отмечено низкое содержание коэнзима Q10 в группе «Физ.раствор», что может говорить о высокой потребности обоих полушарий мозга в коэнзиме Q10.

В ипсилатеральном полушарии группы «Убихинол» содержание коэнзима Q10 по значениям соответствовало здоровому состоянию мозга, а в группе «Убихинол» контралатерального полушария превышало значение на 13% в сравнении с «Интактной» группой. В группе «Убихинон», содержание коэнзима Q10 достоверно превышало значения в обоих полушариях на 13% и 25% по сравнению со здоровой (интактной) группой.

Сравнение содержания коэнзима Q10 между группами леченых животных и тем, кому вводили плацебо, значительно отличалось и составило: в ипсилатеральном полушарии группы после введения физиологического раствора было достоверно снижено на 27% и 35% по сравнению с группами «Убихинол» и «Убихинон» соответственно.

Достоверной разницы между двумя лечеными группами отмечено не было, тем не менее, содержание коэнзима Q10 в группе «Убихинон» было несколько выше чем в группе «Убихинол» на 1 сутки, что можно объяснить данными фармакокинетики (см. Главу 3), показывающими, что убихинол быстрее накапливается в головном мозге, и к концу первых суток содержание коэнзима Q10 в группе «Убихинол» становится ниже, чем в это же время в группе «Убихинон». В фармакокинетическом исследовании концентрация коэнзима Q10 в группе «Убихинол» через 15 мин была повышена на 116% и на 74 % – в группе «Убихинон», к концу 1 суток значения составили 52% для убихинола и 62% для убихинона, что означает, что убихинол быстрее накапливается в мозге и быстрее уходит из органа, оставаясь все еще достоверно повышенным более чем в 2 раза, убихинон напротив дольше накапливается и дольше остается в мозге, в сравнении с убихинолом. Если этот факт сравнивать с размером некроза после инсульта, то можно заметить, что среднее значение размера некроза в группе «Убихинон» несколько выше, чем в группе «Убихинол», хотя достоверно и не отличается. Поэтому имеет большое значение быстрое создание высоких концентраций в

головном мозге, чем раньше будет проявлять эффект убихинол в более высоких концентрациях, и чем раньше будет начато лечение пациентов, тем эффект от введенного препарата будет выше.

Неврологический статус в группе животных, получавших физиологический раствор и растворитель, был значительно ниже, чем у животных, получавших коэнзим Q10. Некоторые животные не могли выполнять никаких неврологических тестов — они неподвижно находились в углу клетки и не реагировали на прикосновения или совершали вращательные движения вокруг парализованной стороны тела, у некоторых наблюдали эпилептоморфные припадки. При этом большая часть животных с выраженной неврологической симптоматикой не дожила до конца эксперимента и не была включена в окончательную обработку данных. Среди животных, получавших внутривенное введение убихинола, отмечено увеличение среднего суммарного балла по шкале mNSS в 1,5 раза по сравнению с группой, получавшей растворитель [80].

В текущем эксперименте смертность животных, не получавших действующие вещества в первые сутки, составила в среднем 42%. Внутривенное введение растворов убихинола и убихинона приводило к увеличению выживаемости животных. Таким образом, была доказана способность коэнзима Q10 увеличивать выживаемость животных с острой ишемией головного мозга, вне зависимости от его редокс статуса.

Данные согласуются с результатами, полученными ранее в эксперименте с внутривенным введением Кудесана [81]. Так, смертность в группе, получавшей физиологический раствор, составила около 33%, а смертность животных, получавших Кудесан внутривенно, была значительно ниже — 14% (погибли 2 из 14 животных) [81].

Во всех экспериментальных группах отмечена статистически значимая корреляция между размером зоны некроза и содержанием в тканях коэнзим Q10. — чем больше его содержание в ипсилатеральном полушарии, тем меньше площадь поражения головного мозга (Рисунок 14).

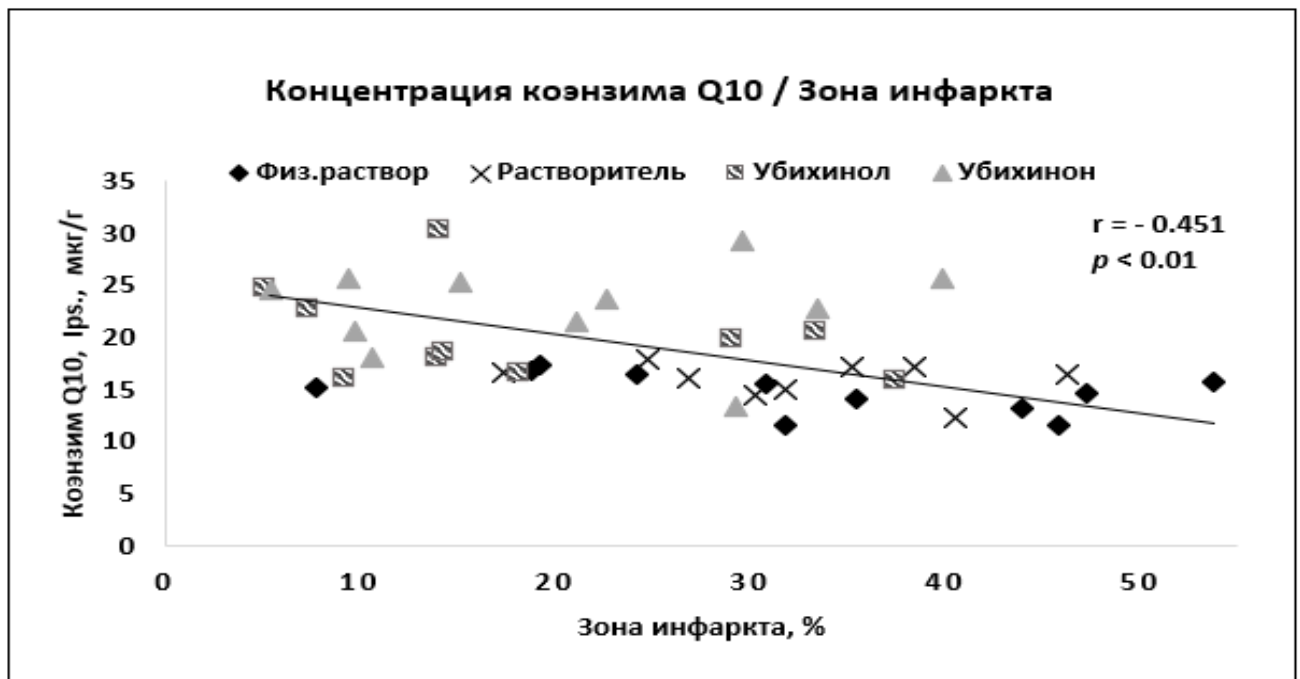


Рисунок 14 – Корреляция между размером зоны некроза через 24 часа после начала ишемии и уровнем коэнзима Q10 в ипсилатеральном полушарии головного мозга крыс после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Физ.раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон

В то же время, в нашем исследовании отмечена корреляция между размерами зоны некроза головного мозга и выраженностью неврологического дефицита: чем больше поражение головного мозга, тем ниже общий балл неврологического статуса [80] (Рисунок 15).

В целом эта связь закономерна и подтверждает данные, полученные другими авторами на аналогичной модели инфаркта головного мозга [81].

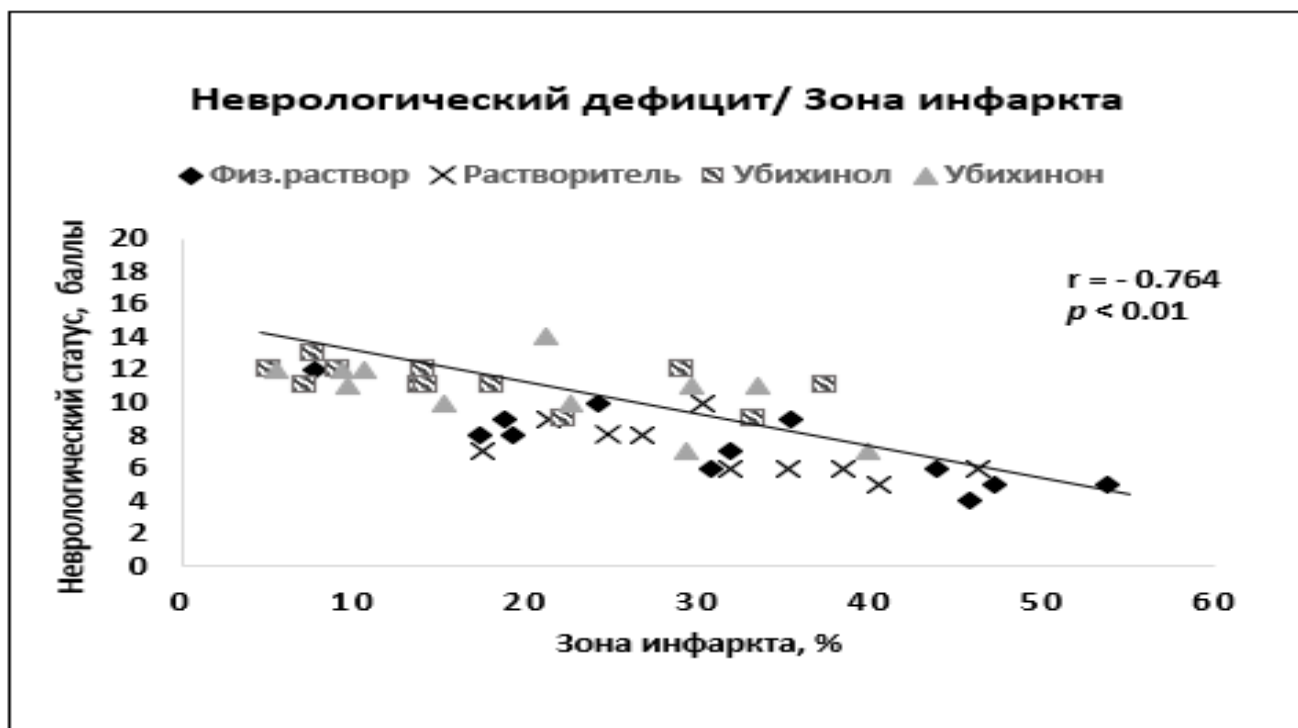


Рисунок 15 – Корреляция между размерами зоны некроза и выраженностью неврологического дефицита у крыс после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Физ.раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон

Кроме того, выраженность неврологического дефицита тоже коррелировала с содержанием коэнзима в головном мозге. Сниженное количество коэнзима Q10 в головном мозге, особенно в ипсилатеральном полушарии, подвергшемся острой ишемии с последующим формированием зоны некроза, было напрямую связано с тяжестью неврологических нарушений — чем ниже было содержание коэнзима Q10, тем сильнее был выражен дефицит [80] (Рисунок 16).

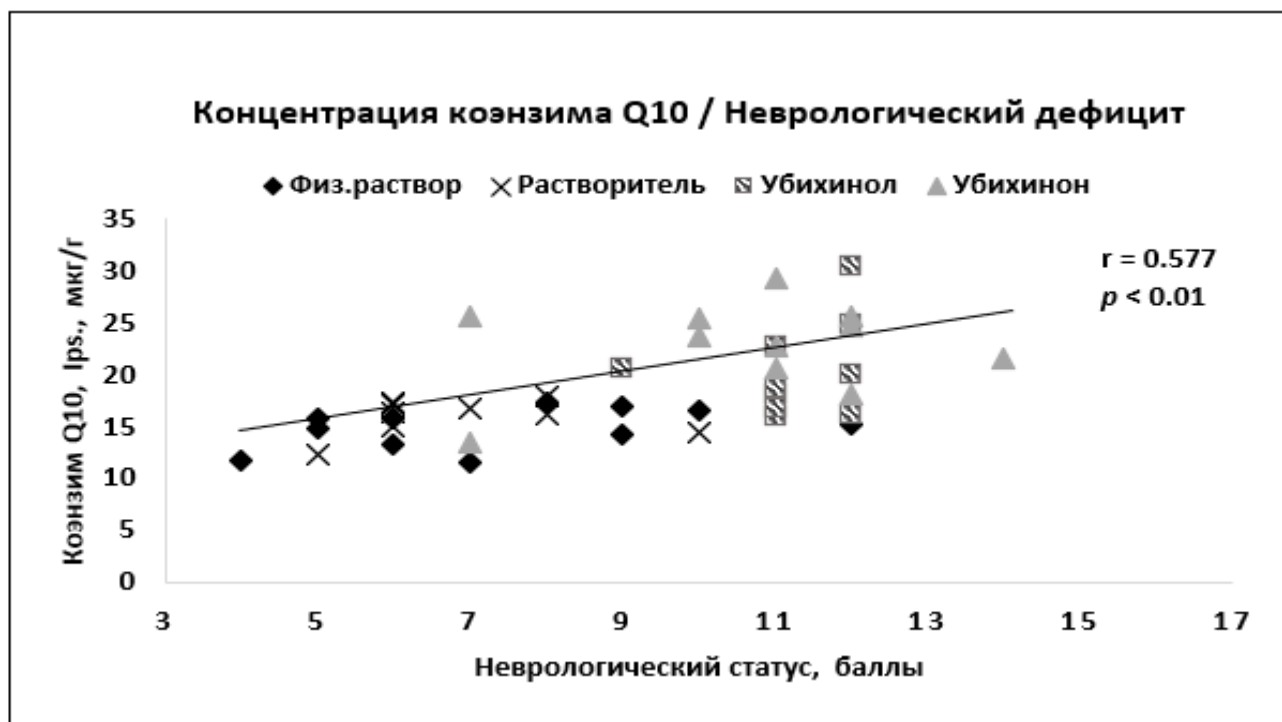


Рисунок 16 – Корреляция между выраженностью неврологического дефицита и содержанием коэнзима Q10 в ипсилатеральном полушарии головного мозга крыс через 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Физ.раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон

Таким образом, улучшение неврологического статуса в группах, получавших внутривенно убихинол или убихинон, было связано с повышением содержания коэнзима Q10 в ипсилатеральном полушарии головного мозга, что сопровождалось ограничением зоны поражения головного мозга. Эксперименты продолжительностью 24 ч показали способность убихинона и убихинола, введенных внутривенно, ограничивать зону некроза головного мозга. Суточный период времени широко используется при оценке нейропротекторной эффективности лекарственных средств и рекомендуется большинством авторов для оценки исхода острого инсульта. В данном эксперименте оба действующих вещества показали одинаковую эффективность – внутривенное введение убихинола привело к ограничению зоны некроза на 40,6%, а в группе животных, получавших убихинон – на 37,5% по сравнению с животными, получавшими растворитель [80] (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Срезы головного мозга крыс через 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии. Окрашивание ТТХ. Жизнеспособная ткань окрашена в малиновый цвет, зона некроза мозга – белая. Группы: Физ. раствор, Растворитель, Убихинол, Убихинон

Некоторые исследователи предполагают, что убихинол имеет преимущество перед убихиноном с точки зрения выраженности антиоксидантной активности. В нашем исследовании была показана способность убихинола значительно ограничивать зону некроза головного мозга к исходу 1-х суток, при этом различия между эффективностью убихинола и убихинона не были статистически значимыми. Равную нейропротекторную эффективность препаратов убихинола и убихинона можно объяснить одинаково успешным пополнением уровня коэнзима Q10 в головном мозге после их внутривенного введения.

Способность убихинола, присутствующего в ткани в повышенном количестве, ограничивать зону некроза обеспечивается важными защитными механизмами, которые направлены на процессы апоптоза различных уровней в клетках, подверженных разрушению в зоне ишемического повреждения. Острая нехватка кислорода, сопровождающая ишемию, приводит к нарушению нормальной функции митохондрий, и как следствие, снижению выработки АТФ. В результате внутривенного введения коэнзима Q10 повышенное содержание в тканях убихинола способно частично нивелировать повышенную утечку электронов из

дыхательной цепи митохондрий и таким образом уменьшить образование разрушительных активных форм кислорода (АФК). Как следствие, вводя коэнзим Q10 внутривенно и повышая его тканевые уровни можно во время ишемии сохранить функцию митохондрий в зоне риска, тормозя формирование цепочек необратимых событий, ведущих к смерти клеток.

Усиление окислительного стресса в зоне ишемии приводит к сужению сосудов головного мозга (вазоспазму) и усугубляет повреждение органов и тканей. Коэнзим Q10, в форме убихинола, влияя на функции эндотелия, уменьшает постишемический вазоспазм и последующие объемы повреждений [3,41].

Процессы воспаления проявляются уже в начале ишемии, что приводит к дополнительному повреждению нейронов и разрастанию зоны некроза. Противовоспалительное действие коэнзима Q10 связано с антиоксидантными и мембраностабилизирующими возможностями убихинола, который также снижает экспрессию цитокинов, связанных с воспалением, и повышает уровни противовоспалительных биомаркеров. Коэнзим Q10 увеличивает уровни белков убиквентина и усиливает аутофагию, проявляя свое антиапоптотическое действие [119].

Таким образом, при возникновении острой ишемии и развитии инсульта одним из определяющих факторов размера последующего повреждения тканей и риска смерти, выраженности формирующегося неврологического дефицита является содержание коэнзима Q10 в мозге.

Выводы по главе

1. Впервые проведено сравнение эффективности двух форм коэнзима Q10, восстановленной – убихинол и окисленной – убихинон, введенных внутривенно после наступления ишемии, по показателям выживаемости, неврологического дефицита, размер площади повреждения головного мозга.
2. В группах животных после парентерального введения убихинола / убихинона отмечено снижение смертности, лучшее сохранение неврологических

функций и менее выраженное повреждение головного мозга после ишемического инсульта.

3. Концентрация коэнзима Q10 в группах, которым вводили исследуемые вещества, к исходу первых суток инсульта оставалась достоверно повышенной в обоих полушариях головного мозга крыс по сравнению с контрольными группами.
4. Впервые в результате проведенного корреляционного анализа показана взаимосвязь выживаемости, неврологического дефицита, величины повреждения головного мозга крысы после ишемии с содержанием коэнзима Q10 в тканях головного мозга. Достоверно показано, что чем выше содержание коэнзима Q10 в головном мозге, тем меньше размер повреждения и лучше состояние животного после ишемического инсульта.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УБИХИНОЛА, ВВЕДЕННОГО ВНУТРИВЕННО В ОСТРОЙ СТАДИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ, РАЗМЕР И ДИНАМИКУ ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ ОТ 1-Х ДО 4-Х СУТОК МЕТОДОМ МРТ, НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЖИВОТНЫХ И ВЫРАЖЕННОСТЬ ДЕФИЦИТА КОЭНЗИМА Q10 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕРЕЗ 4 СУТОК

5.1. Выживаемость

Выживаемость животных снижалась по сравнению с 1 сутками из-за отека и расширения зоны повреждения головного мозга крыс. Смертность, в группе «Растворитель» составила 80% (погибло 20 животных из 25). В группе, получавшей убихинол смертность была значительно ниже — 20% (погибло 1 из 5 животных), $p < 0,01$.

5.2. Неврологический статус

В эксперименте было показано, что в течение четырех дней у животных группы Растворитель ухудшалось физическое состояние и нарастал неврологический дефицит. Через 24 ч после операции суммарный неврологический балл составил $8,6 \pm 1,9$, а к четвертым суткам отмечено достоверное снижение балла до $5,6 \pm 0,5$, $p < 0,05$. Страдали в основном двигательные функции; некоторые животные были живы, но проявляли минимальную двигательную активность и совершали лишь медленные вращательные движения вокруг парализованной стороны. В группе «Убихинол» общий балл был выше к концу 1 суток ($11,0 \pm 0,7$) по сравнению с группой, получавшей растворитель, $p < 0,05$. В течение последующих четырех суток неврологический статус в группе «Убихинол» не ухудшался и к их исходу составил $11,2 \pm 0,4$. Вероятно, однократного внутривенного введения убихинола было достаточно для поддержания жизнеспособности тканей и предотвращения ухудшения неврологического статуса. Животные оставались активными и могли

выполнять тест с подвешиванием за хвост и тест на лазание по вертикальной сетке, хотя у них наблюдалась мышечная слабость в конечностях на пораженной стороне тела. Однако общее физическое состояние животных можно было оценить как удовлетворительное, они не отказывались от еды, постоянно проявляли двигательную активность [80] (Рисунок 18).

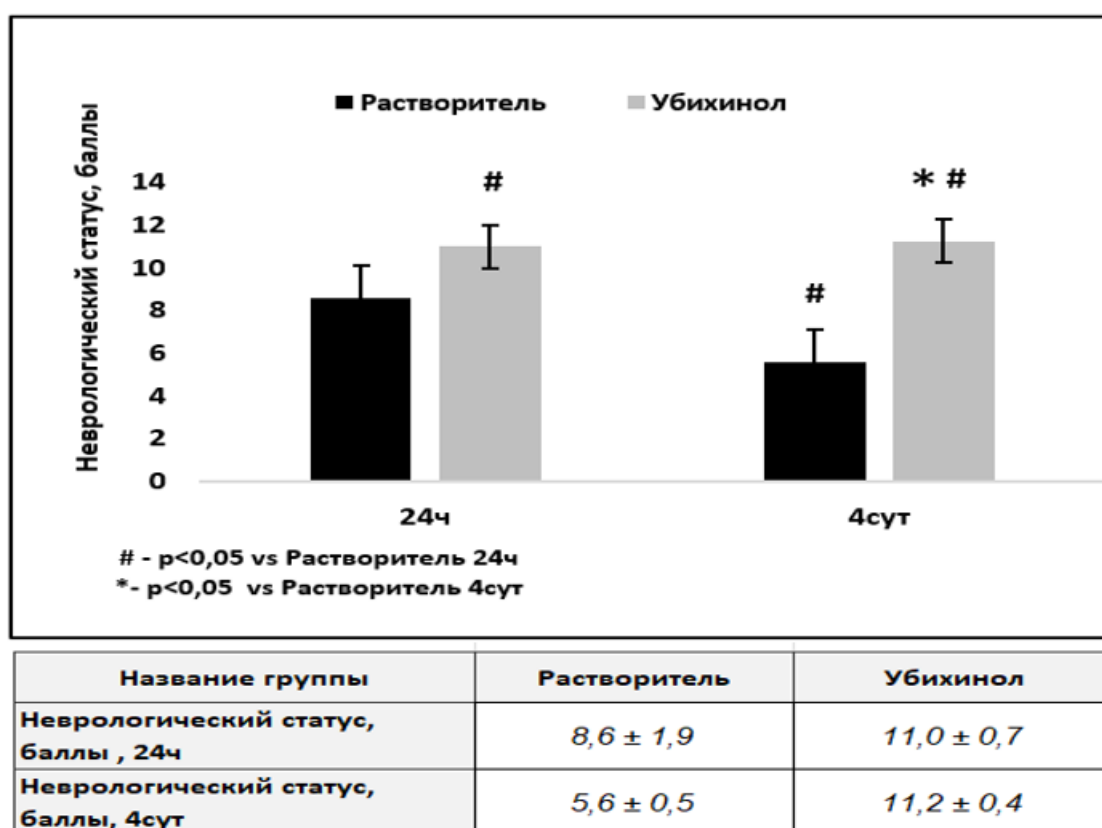


Рисунок 18 – Неврологическая оценка по шкале mNSS через 24 часа и 4 дня после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Растворитель, Убихинол

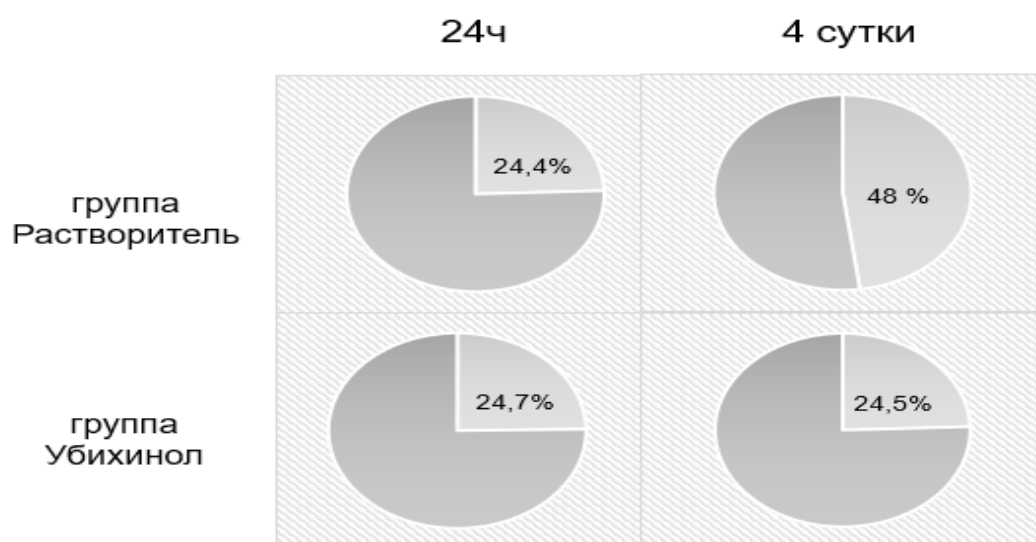
5.3. Размер инфаркта головного мозга на 1 и 4 сутки после окклюзии средней мозговой артерии

Метод МРТ сканирования помогает достаточно точно оценить степень повреждения головного мозга, и во всем мире является надежной диагностикой различных повреждений головного мозга, в том числе в результате ишемического инсульта. На T2 изображениях зона некроза выделит более белой по отношению к неповрежденным областям мозга. МРТ изображения оценивали, измеряя общую площадь поражения, включая область ишемической пенумбры.

На 1 сутки после операции зона повреждения в группе «Растворитель» и группе «Убихинол» составила $24,4 \pm 1,1$ и $24,7 \pm 5,7\%$ соответственно, $p = 0,4$. Однако погибло всего 1 животное из группы «Убихинола», по сравнению с группой «Растворитель», где до конца эксперимента не дожили 80% животных.

Для выявления влияния препарата убихинола на динамику зоны повреждения между 1 и 4 сутками экспериментального инсульта сравниваемые группы «Убихинол» и «Растворитель» были сформированы на основании результатов МРТ на 1 сутки и по принципу равной зоны повреждения. В ходе предварительного пилотного исследования был установлен оптимальный размер площади повреждения ишемическим инсультом, при котором крысы без лечения могли бы дожить до 4 дня и находился в пределах 20%. Такой интервал наблюдений был выбран исходя из фармакокинетического исследования, где показано, повышенное содержание коэнзима Q10 в печени на протяжении 4 суток, и подтвердить гипотезу, что печень является органом - депо для коэнзима Q10. Высвобождаясь в кровь из печени, он повторно разносится в составе липопротеинов по всему организму, в том числе поступает в мозг, таким образом поддерживая повышенные уровни в головном мозге крысы до 4 суток.

К четвертым суткам в группе «Растворитель» наблюдали увеличение площади поражения головного мозга почти в два раза. Зона увеличилась на 96 % и составила $48,0 \pm 9,3 \%$, $p < 0,05$. В группе, получившей однократную внутривенную инъекцию убихинола, увеличения зоны поражения отмечено не было, и к концу 4 суток после ишемии она практически не изменилась: $24,5 \pm 5,6\%$ (Рисунок 19).



Название группы	Растворитель	Убихинол
Зона некроза, % МРТ, 24ч	<i>24,4 ± 1,1</i>	<i>24,7 ± 5,7</i>
Зона некроза, % МРТ, 4сут	<i>48,0 ± 9,3</i>	<i>24,5 ± 5,6</i>

Рисунок 19 – Размер зоны некроза головного мозга через 24 часа и 4 суток после окклюзии средней мозговой артерии в группах Растворитель и Убихинол

Чтобы иметь возможность сравнения морфологических результатов на 1-е сутки по 2-м протоколам (гл.4 и 5) было необходимо убедиться в сходимости результатов 2-х методов оценки размера зоны повреждения головного мозга: методом ТТХ окрашивания и методом МРТ.

Для проведения сравнительного анализа двух методов оценки площади поражения использовали морфологическое измерение площади некроза с помощью окрашивания ТТХ на 4-е сутки после МРТ– исследования. Полученные данные соответствовали размеру поражения, измеренному с помощью МРТ (Таблица 4).

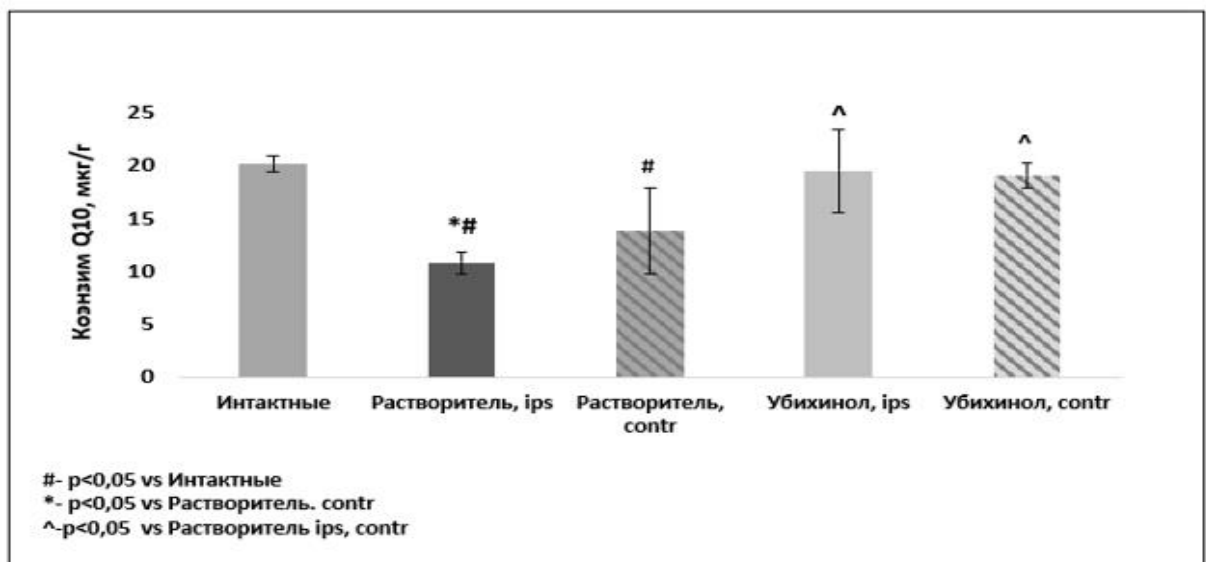
Таблица 4 – Результаты сравнения двух методов оценки площади повреждения головного мозга методом МРТ и ТТХ окрашиванием

Название группы	Растворитель	Убихинол
Зона некроза, % МРТ, 4сут	<i>48,0 ± 9,3</i>	<i>24,5 ± 5,6</i>
Зона некроза, % ТТХ, 4сут	<i>39,6 ± 6,0</i>	<i>22,8 ± 2,0</i>

Скорее всего, к концу 4-х суток эффект отека мозга и ишемической полутени становится не таким значительным, как через 24 ч после операции, следовательно, вся зона ядра ишемии представляет собой только некроз головного мозга. В группе «Растворитель» зона некроза, определяемая только после окрашивания ТТХ, составила $39,6 \pm 8,7$ % и не отличалась от зоны, полученной по МРТ-изображениям, — $48,0 \pm 9,3$ %, $p = 0,5$. Незначительную разницу в размерах можно было бы объяснить особенностью анализа МРТ-изображений, который учитывает как зону некроза, так и окружающую ее ишемическую полутень, и при оценке сканированных изображений трудно сопоставить границу между этими зонами. При окраске ТТХ четко визуализируется зона некроза в виде мертвой белой ткани. По-видимому, у крыс из группы «Растворитель» полутень продолжает существовать не менее 4 суток, а внутривенное введение убихинола приводит к ограничению зоны некроза и тормозит ее развитие уже в первые сутки после операции. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что без лечения площадь поражения головного мозга продолжает увеличиваться в отдаленном периоде после ишемии в течение не менее четырех суток, возможно, за счет разрастания зоны полутени, что открывает дополнительные возможности для терапевтического воздействия, например повторного введения нейропротекторных веществ. По опубликованным ранее данным было показано, что после однократного введения убихинола повышенные уровни коэнзима Q10 сохранялись в головном мозге и печени не менее четырех дней [26, 80, 118]. Скорее всего, одной инъекции убихинола достаточно, чтобы ограничить повреждение головного мозга в отсроченном периоде [80].

5.4. Концентрация коэнзима Q10 в головном мозге у крысы на 4 сутки после окклюзии средней мозговой артерии в исследовании магнитно-резонансной томографии

В эксперименте с МРТ- исследованием определяли уровень коэнзима Q10 в тканях головного мозга. В группе «Растворитель» отмечено достоверное снижение тканевого уровня коэнзима Q10 в обоих полушариях как по сравнению с интактными животными, так и с животными, получавшими внутривенное введение убихинола, $p < 0,01$. Уровень коэнзима Q10 в ипсилатеральном полушарии группы «Растворитель» составил $10,8 \pm 0,7$ мкг/г и было доказано ниже, чем в противоположном (здоровом) полушарии $13,8 \pm 1,0$ мкг/г, $p < 0,05$ (Рисунок 20).



Название группы	Интактные	Растворитель	Убихинол
Коэнзим Q10, мкг/г, Ips	$20,1 \pm 1,7$	$10,8 \pm 0,7$	$19,5 \pm 4,1$
Коэнзим Q10 мкг/г, Contr		$13,8 \pm 1,0$	$19,1 \pm 3,9$

Рисунок 20 – Уровень коэнзима Q10 в головном мозге через 4 суток после окклюзии средней мозговой артерии. Группы: Растворитель и Убихинол; Contr – контрлатеральное полушарие; Ips — ипсилатеральное полушарие

К 4-м суткам после ишемии в группе животных, получавших убихинол, отмечали тенденцию к снижению уровня коэнзима Q10 в головном мозге в обоих полушариях: в ипсилатеральном полушарии он составлял $19,5 \pm 4,1$ мкг/г, а в

контралатеральном полушарии, она составила $-19,1 \pm 3,9$ мкг/г. Однако это снижение не было значительным по сравнению с интактной группой, $p = 0,5$.

Исходя из этого, убихинол, однократно введенный внутривенно в остром периоде инсульта приводит к стойкому накоплению коэнзима Q10 в ткани головного мозга, что, скорее всего, позволяет поддерживать уровень антиоксидантной защиты от ишемически-реперфузионного повреждения и обеспечивает нейропротекторный эффект минимум 4 суток после ишемии головного мозга.

Обсуждение

В данном эксперименте наибольший интерес для нас представляло изучение динамики зоны поражения головного мозга после 1 суток формирования инфаркта головного мозга.

В большинстве исследований авторы непосредственно изучают ранний острый период ишемии (средняя продолжительность эксперимента — 24 ч); однако большой интерес представляют и изменения, происходящие в зоне повреждения в отсроченный период. Так, известно, что каскад патогенетических реакций будет нарастать после первых суток ишемии — продолжает развиваться отек мозга, процесс кальциевой эксайтотоксичности приводит к распространению зоны некроза через область пенумбы дальше по мозгу. Ряд авторов показывают, что после первых суток происходит уменьшение зоны некроза в головном мозге [129]. Такое уменьшение может быть обусловлено формированием глиального рубца, который как бы «стягивает» мозговую ткань, а также рядом методических особенностей при расчете размеров зоны некроза на 1 день. Поэтому в нашем исследовании мы использовали формулу, учитывающую вклад отека головного мозга в размер зоны поражения: в первые 24 ч из-за выраженного отека, мозг гипергидратирован, а иногда ипсилатеральное полушарие может даже превышать контралатеральное по размеру. Это необходимо учитывать при окончательном расчете поражения головного мозга. Некоторые исследователи показали

увеличение размеров зоны поражения головного мозга в отдаленном периоде [59, 80].

Так как в эксперименте, где исследовали размер зоны некроза через 24ч (протокол 2), достоверной разницы в группах животных, получавших растворитель и физиологический раствор, зафиксировано не было, для эксперимента с МРТ-сканированием (протокол 3) было решено оставить только группу с внутривенным введением растворителя, чтобы минимизировать количество использованных животных и соблюдать этический протокол эксперимента.

В эксперименте с МРТ-исследованием смертность животных в группе, получавшей растворитель, к концу 4-х суток увеличилась в два раза – до 80%. Кроме того, у выживших животных этой группы к 4-м суткам отмечали достоверное ухудшение неврологического статуса и снижение суммарного балла неврологического статуса с 8,6 до 5,6 балла.

В группе «Убихинол» смертность животных оставалась на низком уровне, только 1 животное не дожило до конца 4 дня эксперимента. Неврологический статус не менялся на протяжении всего периода наблюдения 11,0 и 11,2 через 24ч и 4 суток соответственно.

Уровень смертности животных в группе, получавшей растворитель, был очень высоким. Большинство животных в этой группе не дожили до конца эксперимента и не были включены в окончательный расчет данных. Однако размеры зоны повреждения головного мозга у животных, переживших 24 ч, но не доживших до конца эксперимента, были сопоставимы с данными, полученными в эксперименте протокола 2, и составили $44,2 \pm 10,2$ %, а максимальное повреждение у одного животного занимало более половины ипсилатерального полушария (55%). Таким образом, в группе, получавшей растворитель, до конца эксперимента доживали только животные с небольшой площадью некроза головного мозга, которая была сравнима с повреждением головного мозга у крыс, после введения убихинола. Размер зоны некроза головного мозга в группе «Растворитель» составил 24,4%, а в группе «Убихинол» — 24,7% [80].

В данном исследовании мы оценивали размер повреждения головного мозга методом МРТ у каждого животного через 24ч после начала ишемии и через 4 суток. В конце эксперимента сравнивали размеры зоны некроза, рассчитанные с помощью МРТ и после окраски с помощью ТТХ. При анализе МРТ-изображений в качестве площади повреждения учитывали область интенсивного изменения цвета (участок погибших нейронов был светлее, чем участок здоровой ткани головного мозга). Конечно, при МРТ оценить зону поражения сложнее, чем при ТТХ окрашивании головного мозга, так как определение границ поражения по интенсивности окрашивания зависит от исследователя и носит достаточно субъективный характер. Кроме того, невозможно четко отграничить зону некроза от зоны ишемической полутени [80] (Рисунок 21, Приложение В).

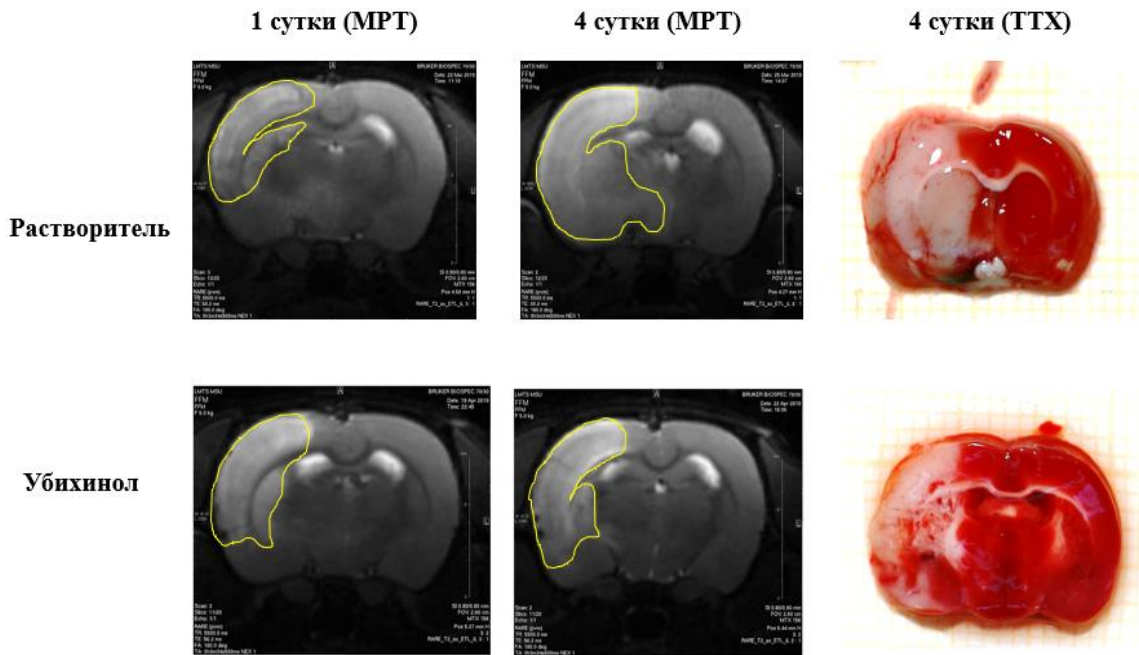


Рисунок 21 – Динамика ишемического поражения головного мозга крыс между первыми и 4-ми суткам. Результаты МРТ-сканирования и ТТХ-окрашивания одних и тех же срезов мозга у одного животного из группы Растворитель и одного – из группы Убихинол. Желтая линия показывает границу области поражения головного мозга

В эксперименте оценивали общую площадь повреждения: некроз плюс окружающая ишемизированная ткань. В конце эксперимента на 4-й день мы провели сравнительную оценку размера поражения головного мозга с помощью МРТ и окраски головного мозга метаболитическим красителем ТТХ, также было

показано, что на 4-е сутки при анализе МРТ-изображений зона повреждения визуализировалась более четко, чем в первые сутки.

В группе, получавшей растворитель, поражение головного мозга составило 48 ± 9 % и существенно не отличалось от размера зоны повреждения при оценке с помощью окрашивания ТТХ ($39,6 \pm 6$ %). В группе «Убихинол» зона поражения по МРТ-анализу составила 24,5%, а при оценке окрашивания ТТХ - 22,7%. Таким образом, можно предположить, что зона поражения головного мозга к 4-м суткам после ишемии представлена преимущественно некрозом, который четко визуализируется при окрашивании ТТХ и на МРТ-изображениях. Это дает возможность рассматривать наши результаты по оценке зоны ишемического повреждения, полученные методом МРТ и ТТХ – окрашивания, как равно объективные.

Несмотря на то, что регистрация коэнзима Q10 в мозге крыс с помощью ВЭЖХ является простым и широко распространенным методом, исследований, описывающих изменение коэнзима Q10 при ишемии, немного [77]. В нашем исследовании при анализе тканевого содержания коэнзима Q10 в ткани головного мозга было показано, что ишемия приводит к истощению эндогенного запаса коэнзима Q10 в обоих полушариях [80] (Рисунок 20).

Более выраженное уменьшение отмечено в ипсилатеральном полушарии, в котором располагалась зона некроза. Однако количество эндогенного коэнзима Q10 также было истощено в контралатеральном полушарии, скорее всего, потому что мозг является единой функционирующей системой и патологические ишемические процессы затрагивают оба полушария. В фармакокинетическом исследовании (протокол 1) солюбилизованного раствора убихинола для внутривенного введения было показано, что через четыре дня после однократного внутривенного введения уровень коэнзима Q10 в головном мозге остается значительно повышенным [80,118]. Внутривенное введение убихинола и убихинона привело к восстановлению общего уровня коэнзима Q10 в головном мозге обоих полушарий до значений интактных животных. Таким образом, можно предположить, что именно стойкое накопление коэнзима Q10 в головном мозге уже

в 1 сутки способствовало нейропротекторному эффекту, выражающемся в снижении смертности, ограничении зоны некроза и улучшении неврологических функций у животных [80]. В отсроченном периоде на 4 сутки произошло дальнейшее снижение уровня коэнзима Q10 в головном мозге. В группе «Растворитель» больше пострадало ипсилатеральное полушарие – в нем наблюдали достоверное снижение уровня коэнзима Q10 как по сравнению с контралатеральным полушарием, так и с уровнем в головном мозге у интактных животных. В группе «Убихинола» снижение тканевого содержания коэнзима Q10 в головном мозге не было статистически значимым по сравнению с интактными животными. Следовательно, однократное внутривенное введение убихинола обеспечивало стойкое сохранение повышенных уровней коэнзима Q10 в головном мозге в течение не менее четырех дней, что сопровождалось выраженной нейропротекцией в этот же период ишемии.

Выводы по главе

В этой части исследования мы доказали высокую нейропротекторную эффективность солубилизованного раствора убихинола. Внутривенное введение убихинола после возникновения церебральной ишемии приводило к долговременному накоплению коэнзима Q10 в головном мозге крыс, снижению смертности, улучшению неврологических исходов и ограничению размеров некроза головного мозга не только в остром периоде ишемии, но и в отсроченном периоде в течение минимум четырёх суток [80].

Так, при возникновении острой ишемии и развитии инсульта одним из определяющих факторов размера последующего повреждения тканей и риска смерти, выраженности формирующегося неврологического дефицита является содержание коэнзима Q10 в мозге.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что внутривенное введение убихинола может быть эффективным при лечении инсульта и в качестве

дополнительного нейропротекторного средства при введении непосредственно перед тромбэктомией или тромболитической терапией.

В результате показано, что убихинол, введенный внутривенно однократно, в остром периоде ишемии не только уменьшает очаг поражения на 1 сутки благодаря накоплению коэнзима Q10 в клетках головного мозга и поддержанию антиоксидантного статуса мозговой ткани во время ишемии, но и препятствует дальнейшему увеличению зоны некроза за счет сдерживания патогенетических каскадов, ведущих к ее увеличению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В текущей работе впервые были представлены результаты фармакокинетики и нейропротекторных (именно антиоксидантных) свойства убихинола – восстановленной формы коэнзима Q10 при его парентеральном введении. Из научных публикаций как зарубежных, так и отечественных известны лишь единичные случаи внутривенного введения коэнзима Q10 при различных патологических состояниях [81, 139]. Данные по фармакокинетическим исследованиям представлены только для внутреннего применения [75]. Известно, что длительное кормление животных приводит к постепенному повышению уровня коэнзима Q10 в плазме крови [83]. Несмотря на многочисленные исследования при различных сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях, применение убихинола внутрь не приводит к быстрому и значительному накоплению коэнзима Q10 в органах и тканях, что ограничивает его применение в ситуациях, требующих немедленного поступления препарата в мозг, таких как ишемический инсульт. Для предотвращения повреждения головного мозга при ишемическом инсульте может быть эффективно только своевременное внутривенное введение действующих веществ, нацеленных на нейропротекторную защиту от дальнейшего развития патологического каскада реакций.

В данной работе для внутривенной лекарственной формы убихинола в дозировке 30мг/кг впервые проведено фармакокинетическое исследование и показано его быстрое накопление в органах и тканях с медленным выведением в течение 8 суток.

На фоне экспериментальной фокальной ишемии головного мозга крыс внутривенное введение убихинола приводило к накоплению коэнзима Q10 в головном мозге в обоих полушариях, ограничению зоны некроза в ипсилатеральном полушарии, улучшению неврологического статуса, включая сенсорные и моторные функции.

Впервые показана зависимость размера зоны формирующегося некротического повреждения, неврологического дефицита и выживаемости после моделирования

острой фокальной ишемии головного мозга от уровня концентраций коэнзима Q10 в головном мозге.

Впервые с применением метода МРТ сканирования доказана способность убихинола, введенного однократно парентерально, на фоне ишемии головного мозга крысы ограничивать размер повреждения мозга на первые сутки инсульта и сдерживать увеличение зоны некроза на протяжении четырех суток.

В результате анализа полученных экспериментальных данных доказано, что внутривенное введение 1% солюбилизованного раствора убихинола приводит быстрому распределению и накоплению в органах и тканях у здоровых животных, проявлению его нейропротекторного эффекта после моделирования острой фокальной ишемии у крыс, по показателям: выживаемость, ограничение зоны некроза и улучшение неврологического функций у животных.

ВЫВОДЫ

1. Внутривенное введение убихинола (однократно), приводит к быстрому накоплению общего коэнзима Q10 в плазме крови, головном мозге, сердце, печени и почках крыс, сохранению его увеличенных уровней на протяжении почти 8 суток после однократного введения.
2. Внутривенное введение убихинола (однократно), после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга по методу Лонга к 1 суткам, способствует поступлению и сохранению общих уровней коэнзима Q10 в головном мозге крыс, как в здоровом полушарии, так и в полушарии с ишемическим повреждением; улучшению неврологического функций; предотвращению разрастания зоны некроза головного мозга по сравнению с контрольными группами «Физ.раствор» и «Растворитель».
3. Однократное внутривенное введение убихинола после моделирования острой фокальной ишемии головного мозга по методу Лонга, к 4 суткам способствует поступлению и сохранению общих коэнзима Q10 в головном мозге крыс, как в здоровом полушарии, так и в полушарии с ишемическим повреждением; улучшению неврологического статуса; предотвращению разрастания зоны некроза головного мозга по сравнению с контрольной группой – «Растворитель».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты исследований внутривенных лекарственных форм убихинола и убихинона доказывают способность коэнзима Q10 в окисленной и восстановленной форме проникать в ткани органов и головной мозг, повышая их антиоксидантную защиту, что может служить основанием для возможного применения в терапии острых ишемических состояний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AMPK/TSC2 mTOR p53	сигнальный путь активирующий апоптоз
AMPK	АМР-активируемая протеинкиназа
BDNF	нейротрофический фактора мозга
CD 31	эндотелиальный гликопротеин клеточной адгезии
CLCN6	потенциал-зависимый хлоридный канал
CLDN5	клаудин 5
GBD	мировая статистика глобального бремени болезней (Global Burden Diseases)
GLS2	глутаминаза 2
HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
IL-1 β	провоспалительный цитокин, член семейства интерлейкина 1
LDLR	рецептор липопротеинов низкой плотности
MCAO	окклюзия средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion)
MicroRNA-149-5p	микрорибонуклеиновая кислота (микроРНК)
MLKL	киназы смешанного происхождения (mixed lineage kinase domain like pseudokinase)
mNSS	модифицированная шкала неврологического дефицита (modified neurological stroke score)
mTOR	мишень рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin)
PARP 1	поли(АДФ-рибоза)-полимеразы
PTEN	фосфатаза с двойной субстратной специфичностью (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome)
RAGE	рецептор конечных продуктов гликирования (receptor for advanced glycation end products)

RARE	быстрое получение с усилением релаксации (rapid acquisition with relaxation enhancement)
RIPK1	взаимодействующая с рецептором серин/треонин- протеинкиназа 1(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1)
RNS/ROS	активные формы азота/кислорода (reactive nitrogen species /reactive oxygen species)
SAT1	спермидин/спермин N1-ацетилтрансфераза 1
SOD 1	супероксиддисмутаза-1(superoxide dismutase 1)
SRB1	рецептор-мусорщик класса В типа 1 (scavenger receptor class В type 1)
TNF-alpha	фактор некроза опухоли (tumour necrosis factor - alpha)
TSC2	комплекс туберозного склероза 2 (TSC complex subunit 2, tuberin)
АКТГ	адренокортикотропный гормон
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИИ	ишемический инсульт
ЛГ	лютеинизирующий гормон
МДА	малондиальдегид (malondialdehyde)
МРТ	магнитно-резонансная томография
НАД+	никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма
ТТХ	2,3,5-Трифенилтетразолий хлористый

ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова, М.А. Нейропротекторная эффективность коэнзима Q10 на модели фокальной ишемии головного мозга в эксперименте: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Белоусова Маргарита Алексеевна; МГУ имени М.В.Ломоносова. - Москва, 2015.- 162 с.
2. Виноградов, О.И. Применение холина альфосцерата (глиатилин) у пациентов с ишемическим инсультом / О.И. Виноградов, В.Д. Даминов, Н.В. Рыбалко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т.113. – №1. – С. 43-45.
3. Влияние убихинола на состояние церебральных эндотелиоцитов в различных структурах головного мозга крыс / Н.С. Шаповал, Малиновская Н.А. , Моргун А.В. [и др.] // Цитология. – 2020. — Т. 62. – № 12. — С. 894 – 902. doi:10.31857/S0041377120120056
4. Возможности применения Цитофлавина при лечении когнитивных и эмоциональных нарушений у пациентов с головными болями напряжения / Л.С. Чутко, С.Ю. Сурушкина, Е.А. Яковенко [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т.119. – №11. – С.32-36. doi:10.17116/jnevro201911911132.
5. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцов. – Москва: Медицина, 2001. – 326 с. – ISBN 5-225-04642-8.
6. Гусев, Е.И. Результаты применения Цитиколина (цераксона) у больных с острым церебральным инсультом / Е.И. Гусев, А.Н. Бойко, В.Л. Бараташвили // Медицина Критических Состояний. – 2010. – Т.1. – № 2. – С. 45-50.
7. Гусев, Е.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова // Нервные Болезни. – 2002. – № 2. – С.3-7.
8. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима q10 у крыс после внутривенного введения убихинола / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 2018. — Т. 52. – № 6. — С. 149–152.

9. Клинические рекомендации. Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. / Утвержден Минздравом России. – 2021. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/171_2
10. Костенко, Е.В. Комплексная терапия пациентов в раннем восстановительном периоде мозгового инсульта: эффективность применения нейропептидных метаболитических препаратов (Семакс®) / Е.В. Костенко, М.А. Энеева // Медицинский Алфавит . – 2015. – Т.1. – №12. – С. 37-43.
11. Куляк, О.Ю. Доклиническое исследование фармакокинетики инновационного препарата коэнзима Q10: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»; 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Куляк Олеся Юрьевна; МГУ имени М.В.Ломоносова. - Москва, 2018.- 131 с.
12. Куркин, Д.В. Антиоксидантное действие Кортексина, Церебролизина и Актовегина у животных с хронической ишемией головного мозга. / Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, А.В. Калатанова // Журнал Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т.121. – №7. – С. 84-89. doi:10.17116/jnevro202112107184.
13. Медико-демографические показатели РФ 2016 год. / Минздрав России. // Стат. справочник. – 2017. – С. 254.
14. Многоцентровое (пилотное) исследование эффективности глиатилина при остром ишемическом инсульте / М.М. Одинак, И.А. Вознюк, М.А. Пирадов [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2010. – Т. 4. – №1 – С. 20-28.
15. Нейропротекторный потенциал убихинола после внутривенного введения на модели фокальной ишемии головного мозга у крыс / О. Н. Оболенская, Е. А. Городецкая, Е. И. Каленикова, О. С. Медведев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. — Минск: Белорусский государственный университет. – 2020. — С. 127–127.
16. Оценка кардиопротекторной эффективности инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения / О.Ю. Куляк, Е.А. Городецкая, Е.И.

Каленикова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81. – №4. – С.8-11. doi:10.30906/0869-2092-2018-81-4-8-11.

17. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности мексидола в комплексной терапии ишемического инсульта в остром периоде / В.И. Скворцова, Л.В. Стаховская, Я.Р. Нарциссов [и др.] // Инсульт. – 2006. – Т.18. – С. 47-54.

18. Роль и возможности антиоксидантной терапии ишемического инсульта / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, О. С. Медведев // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2022. — Т. 85, – № 8. — С. 34–39.

19. Самсонова, Н.А. Клиническая и экспертная характеристика больных с инсультом, впервые признанных инвалидами / Н.А. Самсонова, М.И. Карпова, М.Г. Москвичева // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. — 2016. — Т. 18, – № 10. — С. 35-41

20. Спектр фармакологических эффектов глицина / Т. Потупчик, О. Веселова, Л. Эверт [и др.] // Врач. – 2015. – №12. – С. 14-16.

21. Суслина, З.А. Эпидемиологические аспекты изучения инсульта. Время подводить итоги / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2007. – Т.1. – №2. – С.22-28.

22. Танащян, М.М. Новые возможности нейропротекции в лечении пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения. / М.М. Танащян, М.А. Домашенко // Нервные Болезни. – 2016. – №1. – С.16-20.

23. Танащян, М.М. Опыт применения винпоцетина (Кавинтона) в клинической ангионеврологии / М.М. Танащян, М.А. Домашенко // Нервные Болезни. – 2011. – №2. – С. 12-14.

24. Токарева, О.Г. Влияние коэнзима Q10 на миокард в острой стадии повреждения при экспериментальном инфаркте. / О.Г. Токарева, А.В. Иванов, Н.В. Данилова // – 2014. – Т.77. – №7. – С.8-10.

25. Убихинол как терапевтическое средство: результаты экспериментальных и клинических исследований / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская

[и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2017. — Т. 80. — № 11. — С. 39–42.

26. Фармакокинетика и тканевое распределение коэнзима Q10 при внутривенном введении в окисленной и восстановленной формах / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 2021. — Т. 55, № 7. — С. 3–7.

27. Фармакокинетика и тканевое распределение убихинола при внутривенном введении / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2018. — Т. 81. — С. 103–104.

28. Федин, А.И. Эффективность нейрометаболического протектора цитофлавина при инфарктах мозга (многоцентровое рандомизированное исследование) / А.И. Федин, С.А. Румянцева, М.А. Пирадов // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им И.И.Мечникова. — 2007. — Т. 9. — №1. — С.13-20.

29. Шаповал, Н.С. Оценка влияния коэнзима Q10 на эндотелиальные компоненты гематоэнцефалического барьера в эксперименте: специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология» диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Шаповал Наталья Сергеевна; МГУ имени М.В. Ломоносова. - Москва, 2022.- 118 с.

30. Эффективность нейрометаболического протектора цитофлавина у больных, перенесших ишемический инсульт, в раннем восстановительном периоде (многоцентровое рандомизированное исследование) / А. Агафьина, А. Коваленко, С. Румянцева [и др.] // Врач. — 2006. — №1. — С. 60-65.

31. A mouse model of familial ALS has increased CNS levels of endogenous Ubiquinol 9/10 and does not benefit from exogenous administration of Ubiquinol 10 / J. Lucchetti, M. Marino, S. Papa [et al.] // Plos one. — 2013. — Vol. 8. №7. — P. e69540. doi:10.1371/journal.pone.0069540

32. Adhami, F. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy / F. Adhami, G. Liao, Y.M. Morozov // Am J Pathol. — 2006. — Vol.169. №2. — P. 566-583. doi:10.2353/ajpath.2006.051066

33. Alawieh, A. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice / A. Alawieh, E.F. Langley, S. Tomlinson // *Sci Transl Med.* – 2018. – Vol.10. №441. – P.eaao6459. doi:10.1126/scitranslmed.aao6459
34. Alpha-Glycerophosphocholine in the mental recovery of cerebral ischemic attacks. An Italian multicenter clinical trial / S.G. Barbagallo, M. Barbagallo, M. Giordano [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 1994. – Vol.717. – P. 253-269. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb12095.x
35. Anderson, D. Revision of Council of Europe Convention ETS 123 Guidelines for the Accommodation and Care of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes / D. Anderson // *Altern Lab Anim ATLA.* – 2004. – Vol.32. № Suppl 1A. – P. 183-185. doi:10.1177/026119290403201s30
36. ARTEMIDA Trial (A Randomized Trial of Efficacy, 12 Months International Double-Blind Actovegin): A Randomized Controlled Trial to Assess the Efficacy of Actovegin in Poststroke Cognitive Impairment / A. Guekht, I. Skoog, S. Edmundson [et al.] // *Stroke.* – 2017. – Vol.48. №5. – P. 1262-1270. doi:10.1161/STROKEAHA.116.014321
37. Ayer, A. CoQ10 function and role in heart failure and ischemic heart disease / A. Ayer, P. Macdonald, R. Stocker // *Annu Rev Nutr.* – 2015. – Vol.35. – P. 175-213. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034258
38. Back, T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept / Back T. // *Cell Mol Neurobiol.* – 1998. – Vol.18. № 6. – P. 621-638. doi:10.1023/a:1020629818207
39. Barrington, J. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology? / J. Barrington, E. Lemarchand, S.M. Allan // *Brain Pathol Zurich Switz.* – 2017. – Vol .27. №2. – P. 205-212. doi:10.1111/bpa.12476
40. Bates, A. Myocardial energetics and ubiquinol in diastolic heart failure / A. Bates, Q. Shen, J.B. Hiebert // *Nurs Health Sci.* – 2014. – Vol.16. №4. – P. 428-433. doi:10.1111/nhs.12168

41. Beneficial effect of coenzyme Q10 injection on nitric oxide -related dilation of the rat aorta / L.P. Kozaeva, E.A. Gorodetskaya, E.K. Ruuge [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2017. – Vol.794. – P. 15-19. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.019
42. Bentinger, M. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions / M. Bentinger, M. Tekle, G. Dallner // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – Vol.396. №1. – P. 74-79. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
43. Berezcki, D. Vinpocetine for acute ischaemic stroke / D. Berezcki, I. Fekete // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2008. – Vol.1. – P. CD000480. doi:10.1002/14651858.CD000480.pub2
44. Bhagavan, H.N. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. / H.N. Bhagavan, R.K. Chopra // *Free Radic Res.* – 2006. – Vol. 40. №5. – P. 445-453. doi:10.1080/10715760600617843
45. Bioequivalence of coenzyme Q10 from over-the-counter supplements / M.V. Miles, P. Horn, L. Miles [et al.]// *Nutr Res.* – 2002. – Vol.22. №8. – P. 919-929.
46. Brough, D. Regulation of interleukin-1 in acute brain injury / D. Brough, P.J. Tyrrell, S.M. Allan // *Trends Pharmacol Sci.* – 2011. – Vol.32. №10. – P. 617-622. doi:10.1016/j.tips.2011.06.002
47. Cervellati, R. In vitro antioxidant activity of Ubiquinone and Ubiquinol, compared to vitamin E / R. Cervellati, E. Greco // *Helv Chim Acta.* – 2016. – Vol.99. – P. 41-45. doi:10.1002/hlca.201500124
48. Citicoline for treating people with acute ischemic stroke / A.J. Martí-Carvajal, C. Valli, C.E. Martí-Amarista [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2020. – Vol.8. №8. – P. CD013066.
49. Clinical Effects of Early Edaravone Use in Acute Ischemic Stroke Patients Treated by Endovascular Reperfusion Therapy / M. Enomoto, A. Endo, H. Yatsushige [et al.] // *Stroke.* – 2019. – Vol.50. №3. – P. 652-658. doi:10.1161/STROKEAHA.118.023815
50. Coenzyme Q10 (Ubiquinol-10) Supplementation Improves Oxidative Imbalance in Children With Trisomy 21 / M.V. Miles, B.J. Patterson, Chalfonte-Evans M.L. [et al.] // *Pediatr Neurol.* – 2007. – Vol.37. №6. – P. 398-403. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.08.003.

51. Coenzyme Q10 ameliorates the quality of mouse oocytes during in vitro culture / C.H. Lee, M.K. Kang, D.H. Sohn [et al.] // *Zygote Camb Engl.* – 2022. – Vol.30. №2. – P. 249-257. doi:10.1017/S0967199421000617
52. Coenzyme Q10 and Dementia: A Systematic Review / F.J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, E. García-Martín [et al.] // *Antioxidants (Basel)* – 2023 – Vol.12. № 2 – P. 533. doi: 10.3390/antiox12020533.
53. Coenzyme Q10 as a potential add-on treatment for patients suffering from painful diabetic neuropathy: results of a placebo-controlled randomized trial / P. Amini, F. Sajedi, M. Mirjalili [et al.] // *Eur J Clin Pharmacol.* – 2022. – Vol.78. №12. – P. 1899-1910. doi:10.1007/s00228-022-03407-x
54. Coenzyme Q10 supplementation in acute ischemic stroke: Is it beneficial in short-term administration? / M. Ramezani, Z. Sahraei, L. Simani [et al.] // *Nutr Neuro sci.* – 2020. – Vol.23— №8 – P.640-645. doi:10.1080/1028415X.2018.1541269
55. Cohen, M.M. Ubiquinol (Reduced Coenzyme Q 10): A novel yet ubiquitous nutrient for heart disease / M.M. Cohen // *Advanced Nutrition and Human Metabolism.* – 2015. – Vol.2. – P.e647.
56. Dávalos, A. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial) / A. Dávalos, J. Alvarez-Sabín, J. Castillo // *Lancet Lond Engl.* – 2012. – Vol.380. №9839 – P. 349-357. doi:10.1016/S0140-6736(12)60813-7
57. De Silva, T.M. Cerebral Small Vessel Disease: Targeting Oxidative Stress as a Novel Therapeutic Strategy? / T.M. De Silva, A.A. Miller // *Front Pharmacol.* – 2016. – Vol.7. – P. 61. doi:10.3389/fphar.2016.00061
58. Dixon, S.J. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht // *Cell.* – 2012. – Vol.149. №5. – P. 1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
59. Down-regulated Na(+)/K(+)-ATPase activity in ischemic penumbra after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats / H. Huang, Y.M. Chen, F. Zhu [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8. №10. – P. 12708-12717.

60. Edaravone, a novel radical scavenger, inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) and reverses oxidized LDL-mediated reduction in the expression of endothelial nitric oxide synthase / H. Yoshida, K. Sasaki, Y. Namiki [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2005. – Vol.179. – №1. – P. 97-102. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.037.
61. Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Citicoline 010 Investigators / S. Warach, L.C. Pettigrew, J.F. Dashe [et al.] // *Ann Neurol*. – 2000. – Vol.48. – №5. – P. 713-722.
62. Effect of Ubiquinol Therapy on Sperm Parameters and Serum Testosterone Levels in Oligoasthenozoospermic Infertile Men / A.S. Thakur, G.P. Littarru, I. Funahashi [et al.] // *J Clin Diagn Res*. – 2015. – Vol.9. – №9. – P. BC01-BC03. doi:10.7860/JCDR/2015/13617.6424.
63. Effectiveness of semax in acute period of hemispheric ischemic stroke (a clinical and electrophysiological study) / E.I. Gusev, V.I. Skvortsova, N.F. Miasoedov [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. – 1997. – Vol.97. №6. – P. 26-34.
64. Effects of ubiquinol with fluid resuscitation following haemorrhagic shock on rat lungs, diaphragm, heart and kidneys. / P. Bennetts, Q. Shen, A.R. Thimmesch [et al.] // *Exp Physiol* – 2014. – Vol .99. №7. – P. 1007-1015. doi:10.1113/expphysiol. – 2014. – 078600
65. Effects of vinpocetine on the redistribution of cerebral blood flow and glucose metabolism in chronic ischemic stroke patients: a PET study / G. Szilágyi, Z. Nagy, L. Balkay [et al.] // *J Neurol Sci*. – 2005. – Vol.229-230. – P. 275-284. doi:10.1016/j.jns.2004.11.053.
66. Efficacy of cytoflavin in patients in the acute ischemic stroke / M.M. Odinak, V.I. Skvortsova, I.A. Vozniuk [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. – 2010. – Vol.110. — №12. – P. 29-36.
67. Efficacy of Korteksin in acute period of hemispheric ischemic stroke / L.A. Belova, V.V. Mashin, V.V. Abramova [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. – 2018. – Vol .118. №7. – P. 30-34. doi:10.17116/jnevro20181187130

68. Estimation of the linearity of Ubidecarenone pharmacokinetics after intravenous administration / E. Kalenikova, E. Gorodetskaya, M. Belousova [et al.] // *Pharm Chem J.* – 2015. – Vol.48. №12. doi:10.1007/s11094-015-1193-0
69. Evaluation of the efficacy and safety of application of the drug cortexin in the complex rehabilitation of verticalization in patients with ischemic stroke in the acute period / V.V. Mashin, L.A. Belova, I.F. Aizatullin [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* – 2019. – Vol.119. №9. – P. 62-67. doi:10.17116/jnevro201911909162
70. Evans, M. A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations / M. Evans, J. Baisley, S. Barss // *J Funct Foods.* – 2009. – Vol.1. №1. – P. 65-73. doi:10.1016/j.jff.2008.09.010
71. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *Lancet Neurol.* – 2019. – Vol. 18. №5. – P. 459-480. doi:10.1016/S1474-4422(18)30499-X
72. Glycine confers neuroprotection through microRNA-301a/PTEN signaling / J. Chen, Y. Zhuang, Z.F. Zhang [et al.] // *Mol Brain.* – 2016. – Vol.9. №1. – P. 59. doi:10.1186/s13041-016-0241-3
73. Heiss, W.D. Cerebrolysin Acute Stroke Treatment in Asia (CASTA) Investigators. Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial / W.D. Heiss, M. Brainin, N.M. Bornstein // *Stroke.* – 2012. – Vol.43. №3. – P. 630-636. doi:10.1161/STROKEAHA.111.628537
74. Ho, M.J. Blood pressure lowering efficacy of coenzyme Q10 for primary hypertension / M.J. Ho, A. Bellusci, J.M. Wright // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2009. – Vol. 4. – P. CD007435.
75. Hosoe, K. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QHTM) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers / K. Hosoe, M. Kitano, H. Kishida // *Regul Toxicol Pharmacol.* – 2007. – Vol.47. №1. – P. 19-28. doi:10.1016/j.yrtph.2006.07.001
76. Idebenone Ameliorates Rotenone-Induced Parkinson's Disease in Rats Through Decreasing Lipid Peroxidation / B. Avcı, C. Günaydın, T. Güvenç [et al.] // *Neurochem Res.* – 2021. – Vol. 46. №3. – P. 513-522. doi:10.1007/s11064-020-03186-w

77. Imaging mass spectrometry analysis of ubiquinol localization in the mouse brain following short-term administration. / Y. Tatsuta, K. Kasai, C. Maruyama [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – №1. – P. 12990. doi:10.1038/s41598-017-13257-8.
78. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration / M. Nagase, Y. Yamamoto., Y. Miyazaki, H. Yoshino // *Redox Rep Commun Free Radic Res.* – 2016. – Vol.21. №3. – P. 104 -112. doi:10.1179/1351000215Y.0000000026
79. Influence of multimodal effect of Cytoflavin in the acute brain stroke in patients with metabolic syndrome / F.K. Muratov, F.K. Shermukhamedova, B.V. Batocyrenov [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* – 2016. – Vol.116. №12. – P. 44-47. doi:10.17116/jnevro201611612144-47
80. 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 / O. N. Obolenskaya, E. A. Gorodetskaya, E. I. Kalenikova [et al.] // *Antioxidants.* — 2020. — Vol. 9. — №12. — P. 1240. / Внутривенное введение коэнзима Q10 в острый период ишемии головного мозга снижает смертность за счет уменьшения некроза головного мозга и ограничения его увеличения в течение 4 дней на модели инсульта у крыс / О.Н. Оболенская, Е.А. Городецкая, Е.И. Каленикова [и др.] // *Антиоксиданты.* — 2020. — Т. 9. — №12. — С. 1240.
81. Intravenous treatment with coenzyme Q10 improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal brain ischemia in rats / M.A. Belousova, O.G. Tokareva, E.A. Gorodetskaya [et al.] // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2016. – Vol. 67. №2. – P. 103-109. doi:10.1097/FJC.0000000000000320
82. Ishikawa, A. Beneficial effect of ubiquinol, the reduced form of coenzyme Q10, on cyclosporine nephrotoxicity / A. Ishikawa, Y. Homma // *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* – 2012. – Vol.38. №2. – P. 230-234; discussion 234. doi:10.1590/s1677-55382012000200011
83. Kalenikova, E.I. Pharmacokinetics of Coenzyme Q10 / E.I. Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, O.S. Medvedev // *Bull Exp Biol Med.* – 2008. – Vol.146. №3. – P. 313-316. doi:10.1007/s10517-008-0270-8

84. Kaur, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism / J. Kaur, J. Debnath // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2015. – Vol.16. №8. – P. 461-472. doi:10.1038/nrm4024
85. Kikuchi, K. The Efficacy of Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease / K. Kikuchi, S., Tancharoen N. Takeshige // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol.14. №7. – P. 13909-13930. doi:10.3390/ijms140713909
86. Koike, M. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury / M. Koike, M. Shibata, M. Tadakoshi // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 172. №2. – P. 454-469. doi:10.2353/ajpath.2008.070876
87. Lalkovičová, M. Neuroprotection and antioxidants / M. Lalkovičová, V. Danielisová // *Neural Regen Res.* – 2016. – Vol.11. №6. – P. 865-874. doi:10.4103/1673-5374.184447
88. Lambrechts, P. Coenzyme Q10 and ubiquinol as adjunctive therapy for heart failure / P. Lambrechts, S. Siebrecht // *Agro Food Ind Hi-Tech.* – 2013. – Vol.24. – P. 60-62.
89. Langsjoen, P.H. Comparison study of plasma coenzyme Q10 levels in healthy subjects supplemented with ubiquinol versus ubiquinone / P.H. Langsjoen, A.M. Langsjoen // *Clin Pharmacol Drug Dev.* – 2014. – Vol.3. №1. – P. 13-17. doi:10.1002/cpdd.73
90. Langsjoen, P.H. Supplemental ubiquinol in patients with advanced congestive heart failure / Langsjoen P.H., Langsjoen A.M. // *BioFactors Oxf Engl.* – 2008. – Vol.32. №1-4. – P. 119-128. doi:10.1002/biof.5520320114
91. Leber hereditary optic neuropathy: new and emerging therapies / P. Davila-Siliezar, M. Carter, D. Milea [et al.] // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2022. – Vol.33. – №6. – P. 574-578. doi:10.1097/ICU.0000000000000891
92. Li, J. Caspase-1 inhibition prevents neuronal death by targeting the canonical inflammasome pathway of pyroptosis in a murine model of cerebral ischemia / J. Li, J.H. Hao, D. Yao // *CNS Neurosci Ther.* – 2020. – Vol.26. – №9. – P. 925-939. doi:10.1111/cns.13384
93. Li, Q. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease / Q. Li, B.A. Barres // *Nat Rev Immunol.* – 2018. – Vol.18. – №4. – P. 225-242. doi:10.1038/nri.2017.125

94. Linnik, M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats / M.D. Linnik, R.H. Zobrist, M.D. Hatfield // *Stroke*. – 1993 – Vol.24. – №12. – P. 2002-2008. doi:10.1161/01.str.24.12.2002
95. Littarru, G.P. Clinical aspects of coenzyme Q10: An update / G.P. Littarru, L. Tiano // *Nutrition*. – 2010. – Vol.26. №3. – P. 250-254. doi:10.1016/j.nut.2009.08.008
96. Lo, E.H. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke / E.H. Lo, T. Dalkara, M.A. Moskowitz // *Nat Rev Neurosci*. – 2003. – Vol.4. – №5. – P. 399-415. doi:10.1038/nrn1106
97. MacManus, J.P. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain / J.P. MacManus, A.M. Buchan, I.E. Hill // *Neurosci Lett*. – 1993. – Vol.164. – №1. – P. 89-92. doi:10.1016/0304-3940(93)90864-H
98. *Manual of Stroke Models in Rats* / Ed. Wang-Fischer Y. // *Routledge & CRC Press*. – 2009. – Vol.8. – P.41.
99. Meta-analytic assessment of parenteral cytoflavin effectiveness in different neurologic disorders / P.V. Mazin, I.V. Sheshunov, N.K. Mazina [et al.] // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. – 2017. – Vol.117. – №3. – P. 28-39. doi:10.17116/jnevro20171173128-39
100. Mitochondrial Dysfunction in Autism / C. Giulivi, Y.F. Zhang, A. Omanska-Klusek [et al.] // *JAMA J Am Med Assoc*. – 2010. – Vol.304. – №21. – P. 2389-2396. doi:10.1001/jama.2010.1706
101. Molecular mechanisms of regulated necrosis / L. Galluzzi, O. Kepp, S. Krautwald, [et al.] // *Semin Cell Dev Biol*. – 2014. – Vol.35. – P. 24-32. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.006
102. Montenegro, L. In vitro evaluation on a model of blood brain barrier of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles / Montenegro L., Trapani A., Latrofa A. // *J Nanosci Nanotechnol*. – 2012. – Vol.12. – №1. – P. 330-337. doi:10.1166/jnn.2012.5174.
103. Morisco, C. Effect of coenzyme Q10 therapy in patients with congestive heart failure: a long-term multicenter randomized study. / Morisco C., Trimarco B., Condorelli M. // *Clin Investig*. – 1993. – Vol.71. – №8Suppl. – P. S134-S136. Doi:10.1007/BF00226854.

104. Moskowitz, M.A. The science of stroke: mechanisms in search of treatments / M.A. Moskowitz, E.H. Lo, C. Iadecola // *Neuron*. – 2010. – Vol.67. – №2. – P. 181-198. Doi:10.1016/j.neuron.2010.07.002.
105. Nanomicellar formulation of coenzyme Q10 (Ubisol-Q10) effectively blocks ongoing neurodegeneration in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model: potential use as an adjuvant treatment in Parkinson's disease / M. Sikorska, P. Lanthier, H. Miller [et al.] // *Neurobiol Aging*. – 2014. – Vol. 35. — №10.– P. 2329-2346. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.032.
106. Napoli, E. Evidence of reactive oxygen species – mediated damage to mitochondrial DNA Bagheri in children with typical autism / E. Napoli, S. Wong, C. Giulivi // *Mol Autism*. – 2013. – Vol.4. – №1. – P. 2. Doi:10.1186/2040-2392-4-2
107. Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke / A. Tuttolomondo, R. Di Sciacca, D. Di Raimondo [et al.] // *Curr Top Med Chem*. – 2009. – Vol. 9. – №14. – P. 1317-1334. Doi:10.2174/156802609789869646.
108. Neuroprotective effects of coenzyme Q10 on neurological diseases: a review article. / S. Bagheri, R. Haddadi, S. Saki [et al.] // *Front Neurosci*. – 2023. – Vol.17. – P. 1188839. Doi:10.3389/fnins.2023.1188839
109. Neuroprotective effects of coenzyme Q10-loaded exosomes obtained from adipose-derived stem cells in a rat model of Alzheimer's disease / M. Sheykhhasan, R. Amini, A.S. Soleimani [et al.] // *Biomedecine Pharmacother*. – 2022. – Vol. 152. – P. 113224. Doi:10.1016/j.biopha.2022.113224.
110. Neuroprotective effects of glycine for therapy of acute ischaemic stroke / E.I. Gusev, V.I. Skvortsova, S. A. Dambinova [et al.] // *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. – 2000. – Vol.10. – №1. – P. 49-60. Doi:10.1159/000016025
111. Neuroprotective potential of ubiquinol after intravenous administration in a rat model of stroke / O. Obolenskaia, E. Gorodetskaya, M. Belousova [et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. — 2019. — Vol. 29. — № 6. — P. S319–S320.
112. New opportunities for neuroprotective therapy of patients in the acute and early recovery period of ischemic stroke / M.M. Tanashyan, A.A. Raskurazhev, K.I.

Zaslavskaya [et al.] // Ter Arkh. – 2022. – Vol.94. – №6 – P.748-755.
Doi:10.26442/00403660.2022.06.201743.

113. Onur, S. Association between serum level of ubiquinol and NT-proBNP, a marker for chronic heart failure, in healthy elderly subjects / S. Onur, P. Niklowitz, G. Jacobs // BioFactors. – 2015. – Vol. 41. – №1. – P. 35-43. Doi:10.1002/biof.1198

114. Peerapanyasut, W. Ubiquinol supplementation protects against renal ischemia and reperfusion injury in rats / W. Peerapanyasut, K. Thamprasert, O. Wongmekiat // Free Radic Res. – 2014. – Vol.48. — №2. – P. 180-189. Doi:10.3109/10715762.2013.858148.

115. Plasma CoQ10 Status in Patients with Propionic Acidaemia and Possible Benefit of Treatment with Ubiquinol / S. Stanescu, A. Belanger-Quintana, B.M. Fernández-Felix [et al.] // Antioxid Basel Switz. – 2022. – Vol.11. – №8. – P.1588. doi:10.3390/antiox11081588.

116. Potential role of coenzyme Q10 in health and disease conditions / Rodick T.C., Seibels D.R., Babu J.R. [et al.] // Nutr Diet Suppl. – 2018. – Vol. 10. – P. 1-11. Doi:10.2147/NDS.S112119

117. Prangthip, P. An improvement of oxidative stress in diabetic rats by Ubiquinone-10 and Ubiquinol-10 and bioavailability after short- and long-term Coenzyme Q10 supplementation / P. Prangthip, A. Kettawan, J. Posuwan // J Diet Suppl. – 2016. – Vol.13. — №6. – P. 647-659. Doi:10.3109/19390211.2016.1164788.

118. Preclinical study of the pharmacokinetics of a new intravenous dosage form of Ubiquinol / E. Kalenikova, E. Gorodetskaya, O.Y. Kulyak [et al.] // Pharm Chem J. – 2018. – Vol.51. – №3. – P.949-953. Doi:10.1007/s11094-018-1721-9

119. Protection of coenzyme Q10 against contrast-induced acute kidney injury in male diabetic rats / S.M.F. Couto, C.D. da Fonseca, M. Watanabe [et al.] // Diabetol Metab Syndr. – 2021. – Vol.13. – №1. – P. 69. Doi:10.1186/s13098-021-00689-6

120. Prospects of intravenous coenzyme q10 administration in emergency ischemic conditions / E. I. Kalenikova, E. A. Gorodetskaya, O. V. Povarova, O. S. Medvedev // Life. — 2024. — Vol. 14. — P. 134.

121. Radak, D. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke / D. Radak, N. Katsiki, I. Resanovic // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2017. – Vol.15. — №2. – P. 115-122. Doi:10.2174/1570161115666161104095522.
122. Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease / A. Yoritaka, S. Kawajiri, Y. Yamamoto [et al.] // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2015. – Vol.21. – №8. – P. 911-916. Doi:10.1016/j.parkreldis.2015.05.022.
123. Rauchová, H. Coenzyme Q10 effects in neurological diseases. / H. Rauchová // *Physiol Res.* – 2021. – Vol.70. – № Supp 14. – P. S683-S714. Doi:10.33549/physiolres.934712.
124. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke / W.M. Clark, S. Wissman, G.W. Albers [et al.] // *JAMA.* – 1999. – Vol.282. – №21. – P. 2019-2026. Doi:10.1001/jama.282.21.2019
125. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities / M. Conrad, J.P. Angeli, P. Vandenabeele, B.R. Stockwell // *Nat Rev Drug Discov.* – 2016. – Vol.15. №5. – P. 348-366. Doi:10.1038/nrd.2015.6
126. Rodrigo, R. Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities / R. Rodrigo, R. Fernández-Gajardo, R. Gutiérrez [et al.] // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2013. – Vol.12. — №5. – P. 698-714. Doi:10.2174/1871527311312050015.
127. Rumyantseva, S.A. Clinical and morphologic efficacy of a complex antioxidant and energy correction therapy of different duration in brain infarction: results of a multicenter randomized trial / S.A. Rumyantseva, A.L. Kovalenko, E.V. Silina // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* – 2015. – Vol.115. — №8. – P. 45-52. Doi:10.17116/jnevro20151158145-52.
128. Safety and efficacy of Cerebrolysin in early post-stroke recovery: a meta-analysis of nine randomized clinical trials / N.M. Bornstein, A. Guekht, J. Vester [et al.] *Neurol*

Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol. – 2018. – Vol.39. – №4. – P. 629-640. Doi:10.1007/s10072-017-3214-0

129. Salvianolate lyophilized injection promotes post-stroke functional recovery via the activation of VEGF and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway / Q. He, S. Wang, X. Liu [et al.] // Int J Clin Exp Med. – 2015. – Vol.8. – №1. – P. 108-122.

130. Secades, J.J. Citicoline for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Formal Meta-analysis of Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trials / J.J. Secades, J. Alvarez-Sabín, J. Castillo // J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc. – 2016. – Vol. 25. — №8. – P. 1984-1996. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.04.010.

131. Semax in prevention of disease progress and development of exacerbations in patients with cerebrovascular insufficiency / E.I. Gusev, V.I. Skvortsova, E.I. Chukanova [et al.] // Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. – 2005. – Vol.105. – №2. – P. 35-40.

132. Serum coenzyme Q10 is associated with clinical neurological outcomes in acute stroke patients / L. Simani, F. Ryan, S. Hashemifard [et al.] // J Mol Neurosci. – 2018. – Vol.66. — №1. – P. 53-58. Doi:10.1007/s12031-018-1115-1.

133. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood / K. Matsuo, K. Kasai, K. Hosoe [et al.] // Biomed Chromatogr BMC. – 2016. – Vol.30. – №4. – P. 500-502. Doi:10.1002/bmc.3570.

134. Stakhovskaya, L.V. Results of a randomized double blind multicenter placebo-controlled, in parallel groups trial of the efficacy and safety of prolonged sequential therapy with mexidol in the acute and early recovery stages of hemispheric ischemic stroke (EPICA) / L.V. Stakhovskaya, N.A. Shamalov, D.R. Khasanova // Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. – 2017. – Vol.117. — №3-2. – P. 55-65. Doi:10.17116/jnevro20171173255-65.

135. Study cytoflavin dose-dependent effect in the treatment of acute ischemic stroke / I.E. Sazonov, A.A. Kudinov, E.P Fedotova [et al.] // Zhurnal Nevrol Psikhiatrii Im SS Korsakova. – 2017. – Vol.117. №2. – P. 64-67. Doi:10.17116/jnevro20171172164-67.

136. Systematic Review of Traumatic Brain Injury and the Impact of Antioxidant Therapy on Clinical Outcomes / Q. Shen, J.B. Hiebert, J. Hartwell [et al.] // *Worldviews Evid Based Nurs.* – 2016. – Vol.13. — №5. – P. 380-389. Doi:10.1111/wvn.12167.
137. Tekin, E. Structural and electronic features of the ubiquinone and ubiquinol molecules: Molecular dynamics and quantum chemical treatments / E. Tekin, S. Erkoç // *Mol Simul.* – 2010. – Vol.36. – P. 763-771. Doi:10.1080/08927021003752838.
138. The effect of coenzyme Q10 as a part of standard therapy on plasma concentrations of ubiquinol, ubiquinone, total CoQ10 and its redox state in patients with ischemic heart disease / V.I. Zozina, E.V. Shikh, S.N. Kondratenko [et al.] // *Curr. Drug. Metab.* – 2022. – Vol.23. — №12. – P. 991-999. Doi:10.2174/1389200224666221123092256.
139. The Impact of Coenzyme Q10 on Neurodegeneration: a Comprehensive Review / M. Kadian, G. Sharma, S. Pandita [et al.] // *Curr Pharmacol Rep.* – 2022. – Vol. 8. – № 119. – P. 1-19. Doi:10.1007/s40495-021-00273-6.
140. The neuroprotective effect of MicroRNA-149-5p and coenzymeQ10 by reducing levels of inflammatory cytokines and metalloproteinases following focal brain ischemia in rats / E. Ghasemloo, S. Oryan, M.R. Bigdeli [et al.] // *Brain Res Bull.* – 2021. – Vol.169. – P. 205-213. Doi:10.1016/j.brainresbull.2021.01.013.
141. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility / R.K. Sharma, F.F. Pasqualotto, D.R. Nelson [et al.] // *Hum Reprod Oxf Engl.* – 1999. – Vol.14. — №11. – P. 2801-2807. Doi:10.1093/humrep/14.11.2801.
142. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs / T. Zhu, L. Wang, L.P. Wang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol.148. – P. 112719. Doi:10.1016/j.biopha.2022.112719.
143. Three-year follow-up of high-dose Ubiquinol supplementation in a case of familial multiple system atrophy with compound heterozygous COQ2 mutations / J. Mitsui, K. Koguchi, T. Momose [et al.] // *Cerebellum Lond Engl.* – 2017. – Vol.16. – №3. – P. 664-672. Doi:10.1007/s12311-017-0846-9.

144. Tissue distribution and redox status of coenzyme q10 after intravenous administration of ubiquinol to rat / N. Shapoval, O. Obolenskaia, E. Kalenikova [et al.] // *Journal of Hypertension*. — 2018. — Vol. 36. — P. e149–e150.
145. Tocotrienol vitamin E protects against preclinical canine ischemic stroke by inducing arteriogenesis / C. Rink, G. Christoforidis, S. Khanna // *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. — 2011. — Vol.31. — №11. — P. 2218-2230. Doi:10.1038/jcbfm.2011.85.
146. Transport via Niemann-Pick C1 Like 1 contributes to the intestinal absorption of ubiquinone / S. Nashimoto, Y. Takekawa, Takekuma Y. [et al.] // *Drug Metab Pharmacokinet*. — 2020. — Vol.35. — №6. — P. 527-533. Doi:10.1016/j.dmpk.2020.08.002.
147. Tuo, Q.Z. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications / Q.Z. Tuo, S.T. Zhang, P. Lei // *Med Res Rev*. — 2022. — Vol.42. — №1. — P. 259-305. Doi:10.1002/med.21817.
148. Ubiquinol decreases hemorrhagic shock/resuscitation-induced microvascular inflammation in rat mesenteric microcirculation / Q. Shen, N. Holloway, A. Thimmesch [et al.] // *Physiol Rep*. — 2014. — Vol.2. — №11. — P. e12199. Doi:10.14814/phy2.12199.
149. Ubiquinol effect on sperm parameters in subfertile men who have asthenoteratozoospermia with normal sperm concentration / B. Cakiroglu, S. Eyyupoglu, R. Gozukucuk [et al.] // *Nephro-Urol Mon*. — 2014. — Vol.6. — P. e16870. Doi:10.5812/numonthly.16870.
150. Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency / L. García-Corzo, M. Luna-Sánchez, C. Doerrier. [et al.] // *Biochim Biophys Acta BBA – Mol Basis Dis*. — 2014. — Vol.1842. — №7. — P. 893-901. Doi:10.1016/j.bbadis.2014.02.008.
151. Ubiquinol-10 supplementation improves autonomic nervous function and cognitive function in chronic fatigue syndrome / S. Fukuda, J. Nojima, O. Kajimoto [et al.] // *BioFactors Oxf Engl*. — 2016. — Vol.42. — №4. — P. 431-440. Doi:10.1002/biof.1293.
152. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats / Y. Zhang, F. Åberg, E. Appelkvist [et al.] // *J Nutr*. Published online. — 1995. — Vol.125. — №3. — P. 446-453. Doi:10.1093/jn/125.3.446.

153. Virág, L. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death / L. Virág, A. Robaszkiewicz, J.M. Rodriguez-Vargas, F.J. Oliver // *Mol Aspects Med.* – 2013. – Vol.34. – №6. – P. 1153-1167. doi:10.1016/j.mam.2013.01.007.
154. Wainwright, L. CoQ10 Deficient Endothelial Cell Culture Model for the Investigation of CoQ10 Blood–Brain Barrier Transport / L. Wainwright, I.P. Hargreaves, A.R. Georgian [et al.] // *J Clin Med.* – 2020. – Vol.9. – №10. – P. 3236. Doi:10.3390/jcm9103236.
155. Xu, P. Microglial TREM-1 receptor mediates neuroinflammatory injury via interaction with SYK in experimental ischemic stroke / P. Xu, X. Zhang, Q. Liu // *Cell Death Dis.* – 2019. – Vol.10. – №8. – P. 555. Doi:10.1038/s41419-019-1777-9.
156. Yang, W.S. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation / W.S. Yang, B.R. Stockwell // *Trends Cell Biol.* – 2016. – Vol.26. – №3. – P. 165-176. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014.
157. Ziganshina, L.E. Cerebrolysin for acute ischaemic stroke / L.E. Ziganshina, T. Abakumova, C.H. Hoyle // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2020. – Vol.7. – №7. – P. CD007026. doi:10.1002/14651858.CD007026.pub6.
158. Zlatohlavek, L. The effect of coenzyme Q10 in statin myopathy / L. Zlatohlavek, M. Vrablik, B. Grauova // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2012. – Vol.33. – №Suppl 2. – P. 98-101.
159. Zou, J. Coenzyme Q10 supplementation improves cholesterol efflux capacity and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Chinese adults with dyslipidemia / J. Zou, Z. Tian, Y. Zhao // *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* – 2022. – Vol.101. – P. 111703. Doi:10.1016/j.nut.2022.111703.

ПРИЛОЖЕНИЕ А


РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ		(19) RU (11) 2 635 993 ⁽¹³⁾ C1
		(51) МПК A61K 31/122 (2006.01) A61K 47/22 (2006.01) A61K 90/8 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ		
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ		
<p>(21)(22) Заявка: 2016136425, 09.09.2016</p> <p>(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 09.09.2016</p> <p>Дата регистрации: 17.11.2017</p> <p>Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 09.09.2016</p> <p>(45) Опубликовано: 17.11.2017 Бюл. № 32</p> <p>Адрес для переписки: 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолдовское городское поселение, г.п. Кузьмолдовский, ул. Заводская, 3, корп. 245, ЗАО "Научно-производственное объединение "Дом фармации", Макарову В.Г.</p>	<p>(72) Автор(ы): Карлина Марина Валерьевна (RU), Дадали Юрий Владимирович (RU), Пожарицкая Ольга Николаевна (RU), Шиков Александр Николаевич (RU), Макарова Марина Николаевна (RU), Макаров Валерий Геннадьевич (RU), Фомичев Юрий Сергеевич (RU), Медведев Олег Стефанович (RU), Городецкая Евгения Ароновна (RU), Каленикова Елена Игоревна (RU)</p> <p>(73) Патентообладатель(и): Закрытое акционерное общество "Научно-производственное объединение "Дом фармации" (RU)</p> <p>(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2433820 C2, 10.07.2011. RU 2359665 C2, 20.02.2009. WO 2005117838 A1, 15.12.2005.</p>	R U 2 6 3 5 9 9 3 C 1
(54) КОМПОЗИЦИЯ УБИХИНОЛА ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ И СПОСОБ ЕЁ ПОЛУЧЕНИЯ		
<p>(57) Реферат:</p> <p>Изобретение относится к медицине, в частности к композиции убихинола для инъекционного введения и способу ее получения. Композиция убихинола предназначена для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и включает лекарственное вещество (убихинол), поверхностно-активные вещества,</p>	<p>антиоксиданты (прямые и косвенные) и растворители, разрешенные для парентерального введения. Предложенная композиция и способ позволяет получать стабильный при хранении раствор убихинола, пригодный для инъекционного введения. 2 н. и 8 з.п. ф-лы, 6 ил., 1 табл., 24 пр.</p>	R U 2 6 3 5 9 9 3 C 1

Рисунок А.1 – Патент RU 2635993 C1. Композиция Убихинола для парентерального введения и способ ее получения

ПРИЛОЖЕНИЕ Б


РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ		(19) RU ⁽¹¹⁾ 2 554 500 ⁽¹³⁾ C2
		(51) МПК A61K 31/122 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01) A61P 9/14 (2006.01)
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ		
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ		
(21)(22) Заявка: 2013142835/15, 20.09.2013	(72) Автор(ы): МЕДВЕДЕВ Олег Стефанович (RU), КАЛЕНИКОВА Елена Игоревна (RU), ГОРОДЕЦКАЯ Евгения Ароновна (RU), БЕЛОУСОВА Маргарита Алексеевна (RU), ПОВАРОВА Оксана Викторовна (RU)	RU 2 554 500 C2
(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 20.09.2013	(73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU)	
Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 20.09.2013		
(43) Дата публикации заявки: 10.04.2015 Бюл. № 10		
(45) Опубликовано: 27.06.2015 Бюл. № 18		
(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2003111175 A 10.09.2004, RU 2385722 C1 10.04.2010, CZ 301282 B6 30.12.2009, ИСАЙКИН А.И. "Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта". Трудный пациент, апрель 2010, [найдено 24.09.2014], найдено из Интернет: http://t-pacient.ru/articles/6542 . ШИЛОВА М. и др. "Кудесан" комплексный антиоксидант в практике лечения сердечно- сосудистых (см. прод.)		
Адрес для переписки: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное интеллектуальное развитие"		
(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА		
(57) Реферат: Группа изобретений относится к медицине, а именно к неврологии, и касается лечения ишемического инсульта. Для этого осуществляют инъекционное, преимущественно внутривенное, введение убидекарена. Такое введение препарата обеспечивает уменьшение зоны	поражения ткани мозга и уменьшение выраженности неврологического дефицита за счет накопления убидекарена, обладающего выраженным нейропротективным действием, в тканях мозга. 2 н. и 5 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 пр.	
(56) (продолжение): заболеваний". РМЖ, 2006, N20, 1462-1468[найдено 24.09.2014], найдено из Интернет: http://www.rmj.ru/articles_3540.htm . SALAMA M. et al. "Co-Enzyme Q10 to treat neurological disorders: basic mechanisms, clinical outcomes, and future research direction" CNS Neurol Disord Drug Targets 2013 aug;12(5):641-64, реферат, [найдено 24.09.2014], найдено из PubMed PMID:32574157.		
Стр.: 1		

Рисунок Б.1 – Патент RU 2554500 C2. Способ лечения ишемического инсульта

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Группа Растворитель (n=5)

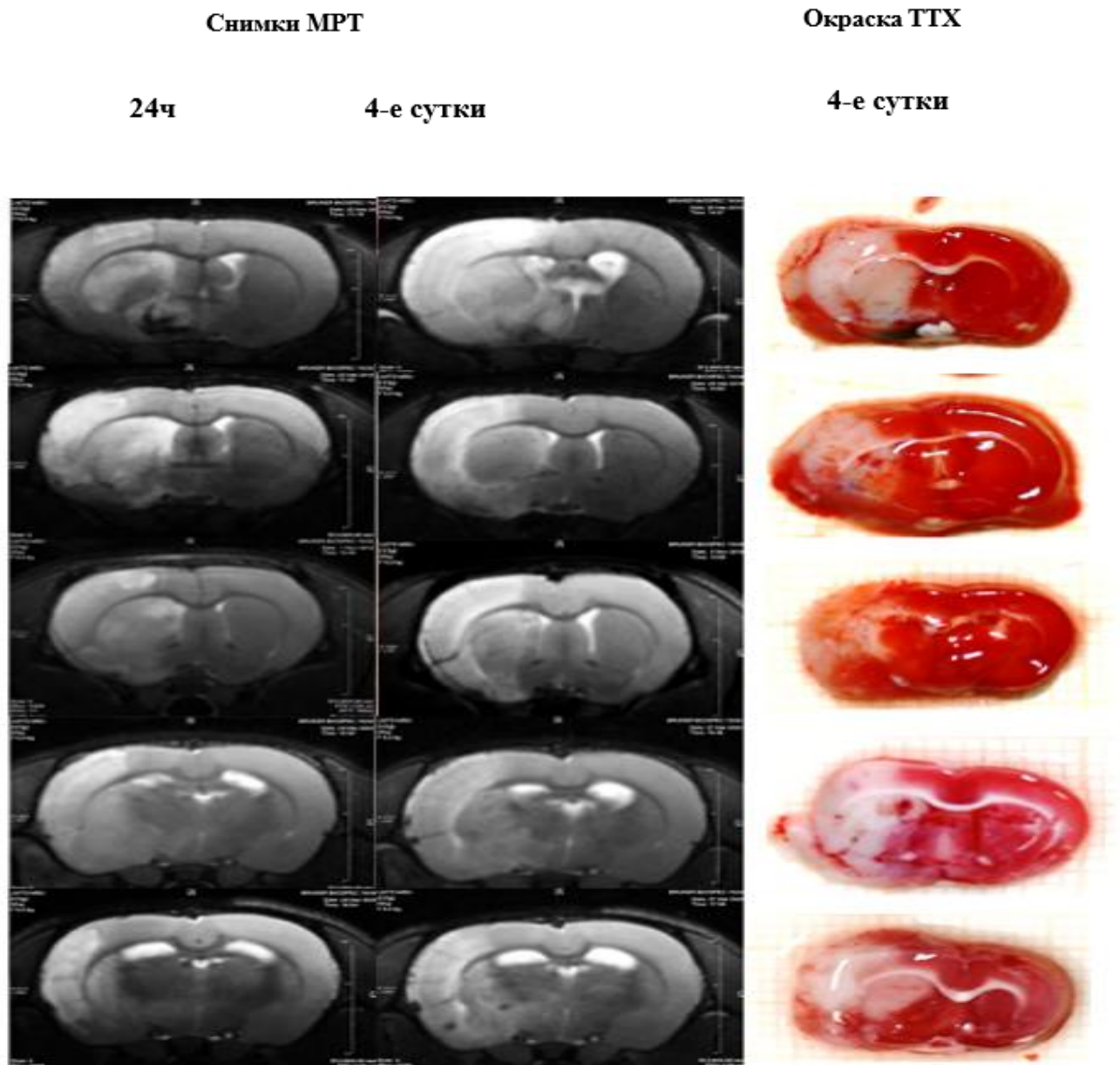


Рисунок В.1 – МРТ-изображения срезов головного мозга крыс, получивших внутривенно растворитель, с максимальной площадью повреждения на 1-е и 4-е сутки инсульта и те же срезы на 4-е сутки, окрашенные ТТХ

Группа Убихинол (n=4)

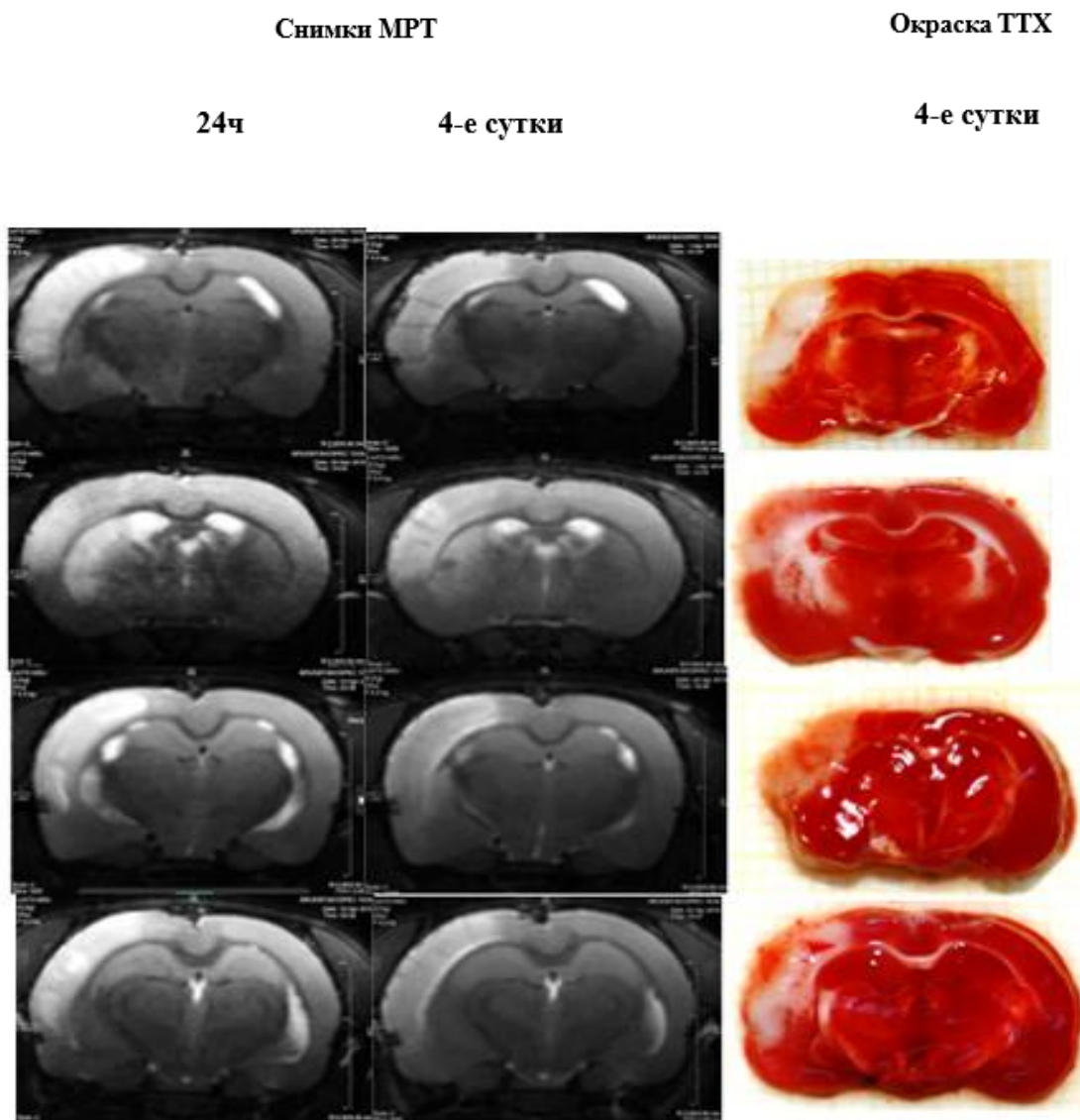


Рисунок В.2 – МРТ-изображения срезов головного мозга крыс, получивших внутривенно убихинол, с максимальной площадью повреждения на 1-е и 4-е сутки инсульта и те же срезы на 4-е сутки, окрашенные ТТХ