

*На правах рукописи*

**Куликова Ольга Игоревна**

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И  
КОМПЛЕКСОВ КАРНОЗИНА В МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ПАРКИНСОНИЗМА, ИНДУЦИРОВАННОГО ЭКЗОГЕННЫМИ НЕЙРОТОКСИНАМИ**

03.01.04 – Биохимия  
03.02.08 – Экология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии» и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель по специальности 03.01.04 «Биохимия»:**

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ «Научный центр неврологии»

**Федорова Татьяна Николаевна**

**Научный руководитель по специальности 03.02.08 «Экология»:**

Доктор биологических наук, профессор, профессор департамента экологической безопасности и менеджмента качества продукции Института экологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

**Орлова Валентина Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

**Яковлев Александр Александрович**

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

**Золотов Николай Николаевич**

Доктор биологических наук, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

**Муронец Владимир Израилевич**

Защита диссертации состоится «24» мая 2022 года в 15.00 часов на заседании ученого совета ПДС 0300.015 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Медицинский институт, РУДН.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт <http://dissoviet.rudn.ru>). Автореферат размещен на сайте [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.015

Доктор биологических наук, профессор Лукашева Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности хроническое прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, характеризующееся необратимой и избирательной гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (кЧС) головного мозга [Tanner C. M., 2014]. БП относится к социально значимым заболеваниям. Несмотря на десятилетия исследований, патогенетические механизмы, лежащие в основе ее развития, остаются недостаточно изученными. В связи с этим, фармакологическое лечение БП сфокусировано на заместительной терапии, восстанавливающей уровень дофамина (ДА) [Olanow C. W., 2015].

Воздействие некоторых экологических факторов, таких как токсичные загрязняющие окружающую среду вещества, главным образом пестициды (ротенон и паракват) и тяжелые металлы (cadmий и свинец), может увеличить риск развития нейродегенеративных заболеваний и, в частности, болезни Паркинсона (БП) [Johnson A. M., 2021]. Загрязняющие вещества попадают в организм человека из выдыхаемого воздуха, загрязненной воды и продуктов питания, а также в результате профессиональной деятельности. Изучение механизмов регуляции гомеостаза как на уровне целого организма, так и клеток и тканей, входящих в его состав, а также разработка методов коррекции его нарушения является одной из важнейших задач эндоэкологии. Одним из ведущих механизмов токсического действия поллютантов, является нарушение окислительного гомеостаза, приводящее к развитию окислительного стресса (ОС) [Schiesling C., 2008]. Повреждение митохондрий и развитие ОС, приводящие к гибели нейронов, рассматриваются как одни из ключевых молекулярных механизмов нейродегенерации при БП [Dorszewska J., 2021].

В условиях ОС целесообразно применение препаратов, способных препятствовать чрезмерному повышению уровня АФК внутри клеток. Одним из наиболее эффективных природных антиоксидантов является карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин), он содержится в большом количестве в мышцах и мозге млекопитающих. Однако, для достижения стабильного протекторного эффекта в условиях экспериментальной индукции ОС требуется введение избыточных доз карнозина, чтобы компенсировать его гидролиз под действием тканевой и сывороточной карнозиназ. Повысить эффективность карнозина можно путем его модификации, обеспечивающей устойчивость дипептида к действию ферментов.

В настоящее время не существует нейропротекторных препаратов с доказанной эффективностью, использующихся в клинике для лечения БП. Создание новых производных карнозина и изучение их антиоксидантных, биологических и нейропротекторных свойств на различных моделях паркинсонизма является актуальной задачей.

**Степень разработанности темы.** Карнозин рассматривают как модулятор активности эндогенной антиоксидантной системы, имеющий исключительную важность для функционирования головного мозга. Обладая широким спектром биологического действия, карнозин напрямую взаимодействует как с инициаторами ОС, так и с продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков [Boldyrev A., 2013]. На моделях экспериментального паркинсонизма у грызунов и на клеточных культурах показан нейропротекторный эффект карнозина (10 мМ или 50-100 мг/кг массы тела животного).

В последнее время появляется все больше синтетических производных и модификаций карнозина, способных защитить его от гидролиза карнозиназами. Показано антиоксидантное и геропротекторное действие нового конъюгата карнозина и Тролокса – водорастворимого аналога витамина Е – S-тролокс-карнозина (STK). Также из карнозина и липоевой кислоты (ЛК) было синтезировано новое вещество ADM\_09 [Nativi C., 2013a] (натриевая соль липоилкарнозина, ЛипК). Было показано, что оно способно нейтрализовать супероксид-радикал *in vitro* в системе ксантин – ксантинооксидаза и в модели оксалиплатин-индуцированного ОС [Nativi C., 2013 а, б]. Новое соединение карнозина с салициловой кислотой (СК) – салицил-карнозин (СцК) может обладать антиоксидантным и нейропротекторным действием. Показано, что СцК не обладает побочными эффектами на желудочно-кишечный тракт при пероральном приеме препарата и способствует заживлению ацетатных язв в желудке [Трубицына И. Е., 2019]. Кроме того, входящая в состав препарата СК должна обладать противовоспалительным эффектом, что актуально для терапии БП в связи с тем, что нейродегенеративный процесс всегда сопровождается нейровоспалительным ответом и активацией провоспалительных факторов [Lee Y., 2019].

В литературе отсутствуют данные о нейропротекторных свойствах новых соединений и комплексов карнозина: STK, СцК, ЛипК и наномицеллярного комплекса карнозин-липоевая кислота (КЛК) в моделях экспериментального паркинсонизма, индуцированного экзогенными нейротоксинами как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

#### **Цель исследования:**

Изучение нейропротекторной эффективности новых соединений и комплексов на основе карнозина в моделях экспериментального паркинсонизма *in vivo* и *in vitro*, вызванного специфическими и неспецифическими для паркинсонизма экзогенными нейротоксинами.

#### **Задачи исследования:**

1. Оценить физико-химические свойства новых соединений и комплексов карнозина (STK, СцК, ЛипК и наномицеллярный комплекс КЛК) в системе *in vitro* (степень устойчивости к гидролизу под действием сывороточной карнозиназы и антиоксидантные свойства).

2. На культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу:

2.1. Оценить влияние экологических факторов (токсичных загрязняющих окружающую среду веществ: тяжелого металла кадмия и пестицидов ротенона и параквата) на гибель клеток;

2.2. Оценить влияние новых соединений и комплексов карнозина на жизнеспособность клеток (собственную цитотоксичность);

2.3. Оценить нейропротекторное действие новых соединений и комплексов в условиях токсичности специфических (индукторы паркинсонизма 6-гидроксиофамин – 6-OHDA и 1-метил-4-фенилпиридиний – MPP+, пестициды ротенон и паракват) и неспецифических (индуктор ОС 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид – ААРН и соль тяжелого металла хлорид кадмия) для паркинсонизма нейротоксинов по жизнеспособности клеток в МТТ-тесте после 24 ч инкубации;

2.4. Выбрать наиболее эффективное соединение карнозина и оценить его влияние на гибель клеток по пути некроза и апоптоза, а также на уровень АФК и уровень катехол- и индоламинов и их метаболитов в условиях ротенон-индуцированного ОС.

3. В экспериментах на крысах линии Вистар оценить:

3.1. Протекторное действие выбранного наиболее эффективного соединения карнозина в модели ранней стадии паркинсонизма у крыс, индуцированного интраназальным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) на двигательную активность животных и пищевое поведение в челночной камере, на содержание катехоламинов в стриатуме и антиоксидантный статус мозга;

3.2. Протекторное действие выбранного наиболее эффективного соединения карнозина в модели паркинсонизма, индуцированного хроническим подкожным введением ротенона на вес животных и количество потребляемой ими пищи за час, на поведение животных в teste «открытое поле», на плотность нейронов в кЧС мозга, на содержание медиаторов- monoаминов и их метаболитов в стриатуме и на антиоксидантный статус мозга экспериментальных животных.

**Объект исследования.** Новые соединения и комплексы карнозина: STK, СцК, ЛипК и наномицелярный комплекс КЛК.

**Предмет исследования.** Нейропротекторная и антиоксидантная эффективность новых соединений и комплексов карнозина в моделях экспериментального паркинсонизма, индуцированного токсичными загрязняющими окружающую среду веществами и специфическими нейротоксинами на клеточной культуре нейробластомы человека, дифференцированной по дофаминергическому типу и крысах линии Вистар.

**Область исследования.** Содержание диссертации соответствует специальностям 03.01.04 «Биохимия» (пункты Паспорта научных специальностей ВАК Министерства науки и высшего образования РФ № 5, 13, 14) и 03.02.08 «Экология» (пункт № 2.4).

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование антиоксидантных свойств и нейропротекторной эффективности новых соединений и комплексов карнозина (STK, СцК, ЛипК и наномицеллярный комплекс КЛК) на клеточно-молекулярном уровне в моделях ОС и токсин-индуцированного паркинсонизма с оценкой наиболее эффективного из них как в экспериментах *in vitro* (на культуре нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу), так и в экспериментальных моделях ранней и поздней стадии паркинсонизма у крыс.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В экспериментах на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу показано, что одним из ключевых механизмов гибели нейронов в условиях действия экзогенных нейротоксинов является ОС. Загрязнители городской среды, сельскохозяйственных угодий и водоемов (тяжелый металл кадмий, пестициды ротенон и паракват) приводят к гибели дофаминергических клеток, в том числе в кЧС, и могут приводить к развитию паркинсонизма. Кадмий относится к суперэкотоксикантам, содержится в загрязненном выхлопными газами и дымом воздухе, имеет исключительную способность к накоплению в живых организмах, в связи с этим разработка препаратов, способных снизить его токсическое действие имеет высокую научную и практическую значимость. Изученные новые соединения и комплексы карнозина – STK, СцК, ЛипК и наномицеллярный комплекс КЛК эффективно препятствуют развитию ОС, индуцированного экзогенными нейротоксинами, защищая клетки от гибели. В экспериментах на животных показано протекторное действие наномицеллярного комплекса КЛК в условиях ротенон- и МРТР-индуцированного паркинсонизма. Полученные результаты послужат обоснованием для разработки и применения высокоэффективных и специфичных препаратов, на основе новых соединений и комплексов природного антиоксиданта карнозина, предназначенных для лечения и профилактики БП.

**Методология и методы исследования.** Дизайн исследований согласуется с принципами проведения аналитических исследований и экспериментов на культурах клеток и на лабораторных животных. Работа проводилась с соблюдением правил проведения научных исследований. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами и этическими нормами. Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых в данной области, публикации в периодических изданиях и методические рекомендации. Изучение нейропротекторной эффективности новых соединений и комплексов

карнозина проводили с использованием современных информативных методов исследования. Исследования *in vitro* проводили на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу. Паркинсонизм и общий ОС моделировали при помощи нейротоксинов. Жизнеспособность клеток культуры определяли по МТТ и ЛДГ-тестам. Количество клеток, погибших по пути апоптоза или некроза, а также количество АФК определяли методом флуоресцентной окраски культуры. Раннюю стадию паркинсонизма у крыс линии Вистар моделировали путем однократного интраназального введения МРТР в дозе 1 мг на ноздрю. Позднюю стадию паркинсонизма моделировали при помощи системного подкожного введения крысам ротенона в дозе 2 мг/кг массы тела. Определение количества клеток в кЧС проводили методом гистологической окраски по методу Нисселя. Уровень катехол-, индоламинов и их метаболитов в структурах мозга и лизатах клеток культуры определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД). Общий антиоксидантный статус ткани головного мозга определяли методом железо-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. STK, ЛипК и СцК обладают абсолютной устойчивостью к действию сывороточной карнозиназы, наномицеллярный комплекс КЛК подвергается гидролизу на 20% медленнее карнозина. STK, ЛипК, СцК и комплекс КЛК обладают прямым антиоксидантным действием и препятствуют образованию гидроперекисей липидов.
2. Наномицеллярный комплекс КЛК повышает выживаемость клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу в условиях эндоэкологического повреждения токсинами: пестицидами ротеноном и паракватом, тяжелым металлом кадмием, 6-OHDA, MPP<sup>+</sup> и ААРН; STK – в условиях токсичности 6-OHDA, ротенона, параквата, ААРН и кадмия; ЛипК – в условиях токсичности ротенона и MPP<sup>+</sup>; СцК – в условиях токсического действия ААРН, кадмия и параквата.
3. В условиях токсического действия пестицида ротенона комплекс КЛК препятствует гибели клеток в культуре по пути некроза и апоптоза, эффективно снижая уровень АФК и нормализуя уровень катехол- и индоламинов и их метаболитов.
4. В модели ранней стадии паркинсонизма, индуцированного однократным интраназальным введением МРТР крысам линии Вистар, двукратное внутрибрюшинное введение комплекса КЛК (100 мг/кг массы тела) на 14 и 15 день после нейротоксина приводит к нормализации показателей метаболизма ДА и серотонина и общей антиоксидантной активности ткани мозга.
5. В модели поздней стадии паркинсонизма, индуцированного хроническим подкожным введением пестицида ротенона крысам линии Вистар, введение животным комплекса КЛК (25 мг/кг массы тела) совместно с ротеноном повышает плотность распределения нейронов в кЧС

и уровень ДА, нормализует показатели оборота ДА в стриатуме, а также увеличивает общую антиоксидантную активность и снижает максимальную интенсивность ПОЛ в ткани мозга.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности результатов исследований обусловлена достаточностью количества проведенных экспериментальных исследований и комплексным подходом, включающим эксперименты *in vitro* и *in vivo*, применением современных методов исследования, адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации были представлены на Второй Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность, нейродегенерация» (Москва, 2016 г.), IX Всероссийском Фестивале науки в Москве (Москва, 2014 г.), XI Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, 2015 г.), IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2015), Международной молодежной научно-практической конференции «People. Science. Innovations in the New Millennium» (Москва, 2015), Международном конгрессе «International Congress on Carnosine and Anserine (ICCA)» (Луисвилл, США, 2017), Международной молодежной научно-практической конференции «Youth of XXI Century in Scientific, Cultural and Educational Environment: New Values, Challenges, Perspectives» (Москва, 2017), XIX Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования» (Москва, 2018). По результатам работы получено 2 патента – № 2647435 от 15.03.2018 и № 2694061 от 9.07.2019.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 178 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения с выводами, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация включает 46 рисунков, 3 таблицы, 223 библиографических источника, из них отечественных – 31, зарубежных – 192.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Материалы и методы исследования**

**Новые соединения и комплексы карнозина.** (S) – 6-гидрокси – 2,5,7,8-тетраметилхроман – 2-карбонил – β-аланил-L-гистидин, S-Тролокс-L-карнозин (STK) был синтезирован в «Hamari Chemicals, Ltd», Япония (Патент JP2008-19188). Конъюгированное соединение липоевой кислоты с карнозином – липоилкарнозин (ЛипК) было синтезировано на кафедре биотехнологии и промышленной фармации РТУ МИРЭА Института тонких химических технологий согласно методике, описанной в работах Nativi и соавт. [Nativi C., 2013 а, б]. Совместно с лабораторией фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им.

В.Н. Ореховича был получен водорастворимый наномицеллярный комплекс карнозина с ЛК – комплекс КЛК (патент № 2647435 от 15.03.2018). Соединение карнозина и СК – салицилкарнозин (СцК) (патент № 2694061 от 09.07.2019) было получено совместно с лабораторией химии физиологически-активных веществ ФГБУН института молекулярной генетики РАН.

**Экспериментальные исследования *in vitro*.** Устойчивость новых соединений и комплексов карнозина в присутствии сывороточной карнозиназы крови доноров определяли методом, предложенным Пеговой А. [Pegova A., 2000]. Оценку общих антиоксидантных свойств исследуемых соединений проводили методом железо-индукционной ХЛ [Федорова Т.Н., 1999]. На культуре нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, по количеству выживших клеток (МТТ-тест) [Gunz F.W., 1948] оценивали нейропротекторный эффект новых соединений в условиях токсического действия неспецифических (АAPH, хлорид кадмия) и специфических (6-OHDA, MPP<sup>+</sup>, ротенон, паракват) для паркинсонизма токсинов. Гибель клеток оценивали по активности лактатдегидрогеназы в среде (ЛДГ-тест) [Holmgren G., 2015]. Оценку уровня АФК и количества погибших по пути некроза и апоптоза клеток проводили методом флуоресцентной окраски йодидом пропидия (PI) и аннексином, соответственно [Fadok V. A., 1992; Creutz C. E., 1992]. Интенсивность флуоресценции детектировали с помощью микроскопа с флуоресцентным блоком и микропланшетного ридера. Уровень моноаминов и их метаболитов определяли методом ВЭЖХ/ЭД [Бережной Д. С., 2018].

**Экспериментальные исследования *in vivo*.** Экспериментальные исследования были проведены на аутбредных крысах самцах линии Вистар в возрасте 2,5-3 месяцев, с массой тела 200-300 г, содержавшихся в стандартных контролируемых условиях вивария при 12 часовом световом цикле. Животные до начала экспериментов не имели ограничений в потреблении корма и имели свободный доступ к воде на протяжении всего времени проведения исследования. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами и этическими нормами [Страсбург, 1986].

Раннюю стадию паркинсонизма моделировали с использованием модифицированной методики Prediger R. (2006) путем однократного интраназального введения МРТР крысам в дозе 1 мг (0,05 мл) на ноздрю. МРТР растворяли в физиологическом растворе (0,9% NaCl) в концентрации 20 мг/мл. На 14 и 15 день после введения МРТР животные (n=30) однократно получали (внутрибрюшинно) исследуемые препараты, из расчета 100 мг/кг массы: карнозин (n=6), ЛК (n=6), наномицеллярный комплекс КЛК (n=6), приготовленные на физиологическом растворе или физиологический раствор (n=6), в соответствии с протоколом эксперимента. Контрольным крысам (n=6) аналогичным с МРТР образом вводили физиологический раствор.

На 28 и 29 день эксперимента проводили исследование двигательной активности животных и пищевого поведения в челночной камере [Бережной Д. С., 2018]. После чего животных декапитировали, головной мозг извлекали на льду и отбирали образцы лобной доли больших полушарий и стриатума, замораживали в жидкому азоте, а затем хранили при -80°C для дальнейших биохимических исследований (определение содержания медиаторов-моноаминов в стриатуме и общего антиоксидантного статуса ткани в лобных долях).

Позднюю стадию паркинсонизма моделировали при помощи системного подкожного введения крысам ( $n=55$ ) митохондриального токсина ротенона в дозе 2 мг/кг массы тела [Zhang Z.N., 2017], растворенного в 2% диметилсульфоксиде и стерильном растительном масле на протяжении 7 или 18 дней (режим 5/2,  $n=9+10$ ). Одновременно с токсином на протяжении 18 дней животные получали внутрибрюшинно исследуемые препараты: карнозин 50 мг/кг массы тела ( $n=9$ ), наномицеллярный комплекс КЛК 50 ( $n=9$ ) или 25 мг/кг массы тела ( $n=9$ ), приготовленные на физиологическом растворе (рН 7.2÷7.4) или физиологический раствор - контрольная группа ( $n=9$ ). В ходе эксперимента регистрировали вес животных (каждые два дня) и проводили тестирование в открытом поле (ОП) (на 8 и 17 день). Для этого использовали круглое ОП, разделенное на секторы, оценивали количество стоек, пройденное расстояние по количеству пересеченных секторов и длительность замираний). Забой животных проводили дважды: на 8 день после начала введения ротенона (группа «Ротенон-7д») для оценки ранних изменений, и на 18 день – остальные 5 групп для характеристики патологии и оценки эффективности исследуемых препаратов. Мозг извлекали на льду и выделяли лобные доли и ростральные области стриатума. Выделенные области мозга помещали в пробирки и немедленно замораживали в жидкому азоте. Блок мозга, содержащий ЧС, также замораживали в парах жидкого азота для дальнейшего гистологического исследования. Образцы мозга хранили при температуре -80°C. Определение количества клеток в кЧС проводили методом гистологической окраски по методу Ниссля.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 10.0 и GraphPad Prism 8.0. Для определения достоверности различий использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с дальнейшим post hoc анализом с использованием критерия LSD Фишера. Для попарного сравнения экспериментальных групп использовали U-критерий Манна-Уитни для выборок с ненормальным распределением и Т-тест Стьюдента для выборок с нормальным распределением. Различия считались достоверными при значении  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ).

## Результаты исследования

### Определение физико-химических свойств новых соединений и комплексов карнозина

#### *Определение устойчивости новых соединений и комплексов карнозина к гидролизу под действием сывороточной карнозиназы.*

Благодаря модификации карнозина по  $\beta$ -аланину, ЛипК, STK и СцК сохраняют абсолютную устойчивость к гидролизу карнозиназой в течение 3 ч (их содержание колеблется около  $100,0 \pm 2,9\%$ , рис. 1), в то время как карнозин за это время практически полностью гидролизуется ферментом. Наномицеллярный комплекс КЛК подвергается гидролизу ферментом в среднем на 20% медленнее карнозина ( $p = 0,0021$ ).

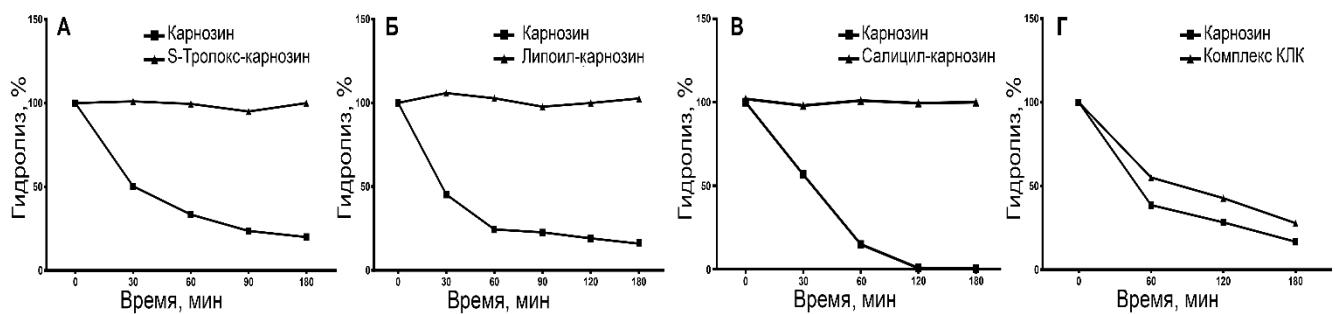


Рисунок 1 – Сравнение устойчивости карнозина и STK (А), ЛипК (Б), СцК (В) и КЛК (Г) к гидролизу сывороточной карнозиназой.

**Оценка антиоксидантных свойств новых соединений и комплексов карнозина в модели Fe-индукционной ХЛ липопротеинов сыворотки крови здоровых лиц.** Все исследуемые новые соединения и комплексы карнозина снижают уровень предобразованных гидроперекисей липидов во всех изученных концентрациях (50 – 1000 мкМ) (табл. 1). Наиболее эффективно уровень гидроперекисей снижает STK.

Таблица 1 – Величина быстрой вспышки ХЛ (h, мВ), отражающая уровень предобразованных гидроперекисей липидов, в % к контролю (принято за 100%).

Концен-трация, мкМ	КЛК	ЛипК	Карнозин	ЛК	Смесь К+ЛК	STK	Тролокс	СцК	СК
50	<b>62,5±4,5*</b>	<b>78±4,5*</b>	98±2,0	86±3,0*	93±7,0	<b>86 ± 2,0*</b>	103 ± 3,0	<b>85,4 ± 1,5*</b>	83,8 ± 1,5*
250	<b>66,5±1,5*</b>	<b>64,5±2,0*</b>	70±4,0*	68±1,0*	61±5,0*	<b>52 ± 0,5*</b>	75 ± 2,0*	<b>72,3 ± 1,5*</b>	70,5 ± 1,5*
500	<b>68±3,0*</b>	<b>61,5±2,0*</b>	54±1,0*	59±3,0*	57±6,0*	<b>45±1,0*</b>	66±2,0*	<b>64,5 ± 1,5*</b>	64,5 ± 1,5*
1000	<b>63±1,0*</b>	<b>60,8±5,0*</b>	44,5±1,5*	59±1,0*	48,1±4,5*	<b>38±5,0*</b>	54 ± 1,5*	<b>63,9 ± 2,5*</b>	57,3 ± 1,0

\*- $p < 0,05$  по сравнению с контролем (по t-тесту Стьюдента)

Все новые соединения и комплексы карнозина обладают антиоксидантной активностью (увеличивают латентный период ХЛ дозозависимым образом, табл. 2). При этом наибольшее влияние на данный показатель оказали КЛК и ЛипК.

Таблица 2 – Длительность латентного периода ХЛ (t, с), отражающая общую антиоксидантную активность соединений, в % к контролю (принятому за 100%).

Концентрация, мкМ	<b>КЛК</b>	<b>ЛипК</b>	Карнозин	ЛК	Смесь К+ЛК	<b>STK</b>	Тролокс	<b>СиК</b>	СК
50	<b>167±1*</b>	<b>151±5*</b>	105±5	100±1	93±5	<b>114±8</b>	107±6	<b>122±6*</b>	109±6
250	<b>183±5*</b>	<b>189±8*</b>	131±2*	100±2	100±1	<b>175±3*</b>	134±5*	<b>141±7*</b>	132±8*
500	∞	<b>201±6*</b>	147±3*	119±6*	100±1	<b>192±6*</b>	170±6*	<b>155±10*</b>	147±8*
1000	∞	<b>233±7*</b>	165±2*	125±3*	157±5*	<b>214±9*</b>	193±2*	<b>167±8*</b>	178±9*

\* - p < 0,05 по сравнению с контролем (по t-тесту Стьюдента)

Таким образом, все изученные новые соединения карнозина оказались более устойчивыми к гидролизу карнозиназой и характеризуются большей антиоксидантной активностью по сравнению с веществами, из которых они были синтезированы. Устойчивость к гидролизу карнозиназой позволит снизить эффективные дозы веществ и продлить время их действия в организме.

### **Оценка антиоксидантного и нейропротекторного действия новых соединений и комплексов карнозина на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу**

**Оценка дозозависимого влияния кадмия и ротенона на жизнеспособность клеток.** Влияние хлорида кадмия (далее кадмий) на жизнеспособность клеток в культуре оценивали в диапазоне концентраций 5 – 50 мкМ (рис. 2А). Токсичность наблюдалась в диапазоне концентраций от 15 до 50 мкМ (p < 0,05). При этом 50%-ое снижение жизнеспособности культуры происходило в промежутке между 20 и 25 мкМ. Для дальнейших экспериментов по оценке нейропротекторной эффективности новых соединений карнозина была выбрана концентрация 20 мкМ, приводящая к снижению выживаемости культуры до  $74,1 \pm 0,8\%$ .

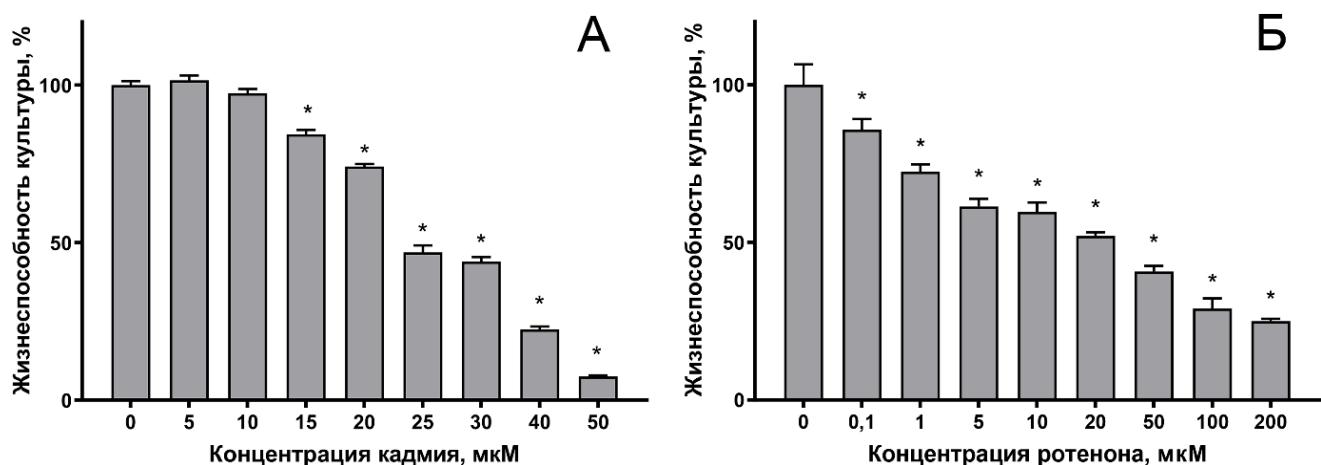


Рисунок 2 – Влияние 5-50 мкМ хлорида кадмия (А) и 0,1-200 нМ ротенона (Б) на выживаемость клеток нейробластомы при 24 ч инкубации. \* – p < 0,05 по отношению к интактным клеткам.

Исследование дозозависимого эффекта токсичности 0,1 – 200 мкМ ротенона (рис. 2Б) на культуру клеток показало, что достоверное снижение жизнеспособности наблюдалось начиная с концентрации 0,1 мкМ, в концентрации 20 мкМ ротенон снижал жизнеспособность до 52% ( $p < 0,001$ ). Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация ротенона 20 мкМ.

**Нейропротекторное действие новых соединений и комплексов карнозина в модели ротенон-индуцированного паркинсонизма.** Инкубация клеток с 20 мкМ пестицида ротенона в течение 24 часов приводила к снижению выживаемости клеток до  $59,7 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,001$ ). Комплекс КЛК повышал выживаемость клеток во всех изученных концентрациях, при этом наиболее эффективно в 0,5 мМ – на  $24,9 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,001$ ) (Рис. 3); ЛипК - в концентрациях 0,1-0,5 мМ, в среднем на 5,9% ( $p < 0,01$ ), при этом наиболее эффективно – в концентрации 0,1 мМ – на  $8,0 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,001$ ); STK повышал выживаемость клеток во всех изученных концентрациях в среднем на 14,1% ( $p < 0,001$ ), при этом наиболее эффективно – в концентрации 0,5 мМ – на  $16,4 \pm 1,9\%$ . СЦК во всех изученных концентрациях оказался неэффективен. Возможно, требуется подбор действующей дозы в более широком диапазоне.

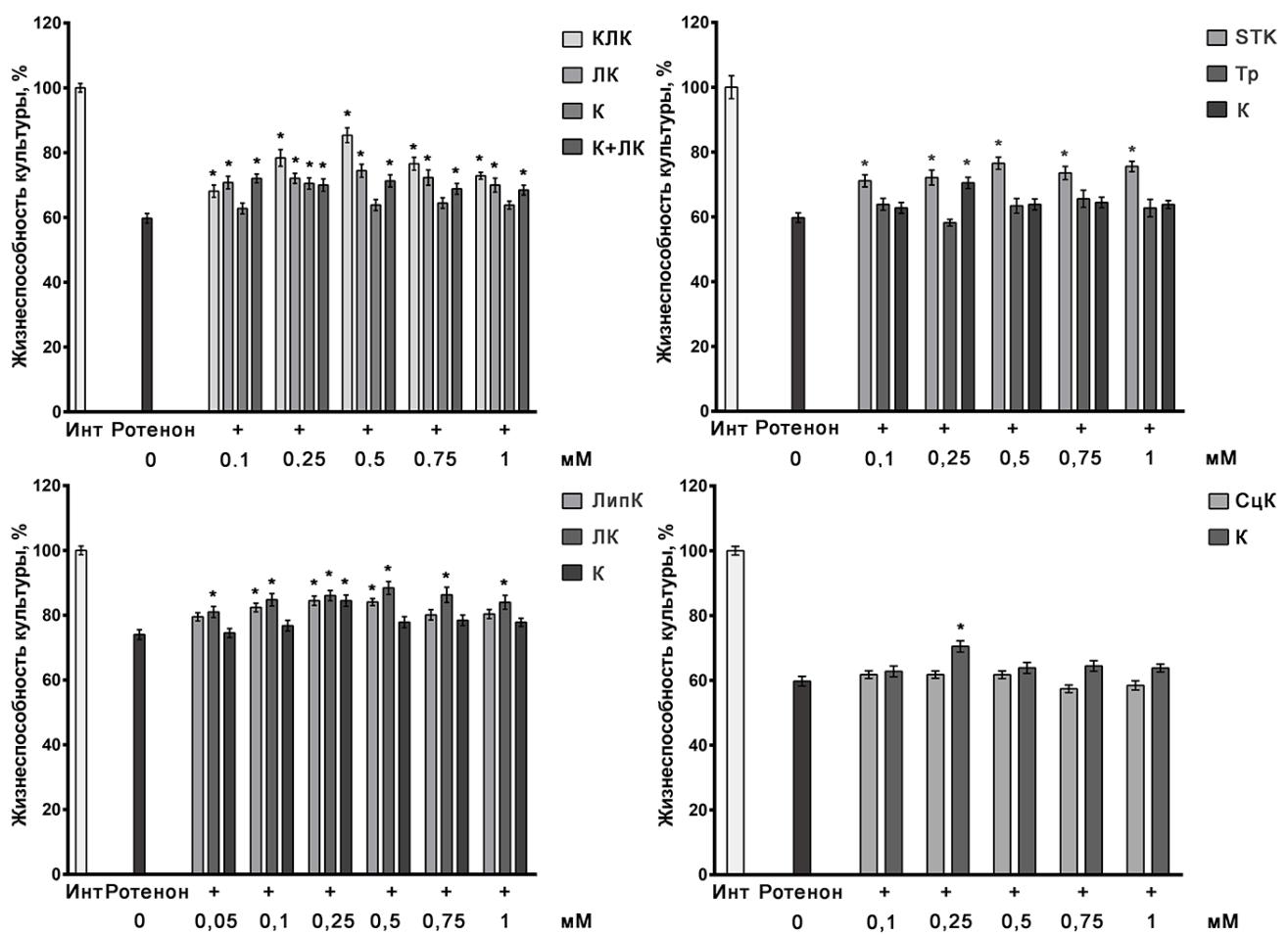


Рисунок 3 – Влияние карнозина (К), ЛК, их смеси (К+ЛК), комплекса КЛК, ЛипК, STK, Тролокса (Тр) и СЦК в концентрациях 0,1 – 1 мМ при 24 ч инкубации на выживаемость клеток нейробластомы в условиях токсичности 20 мкМ ротенона; в % от среднего уровня в интактных клетках, \* –  $p < 0,05$  по отношению к клеткам с ротеноном.

Проведенный в дополнение ЛДГ-тест выявил повышение содержания ЛДГ в среде на  $30,0 \pm 4,2\%$  ( $p < 0,001$ ) в условиях инкубации клеток с 20 мкМ ротенона в течение 24 ч. Внесение в инкубационную среду исследуемых соединений в концентрации 0,5 мМ одновременно с ротеноном препятствовало высвобождению ЛДГ. В целом, данные ЛДГ-теста соответствуют данным МТТ-теста.

Таким образом, способность снижать токсическое действие ротенона свидетельствует о протекторном эффекте комплекса КЛК, ЛипК и СТК на митохондрии, так как, проникая в клетку, ротенон ингибирует цепь переноса электронов, что приводит к ее гибели. На основании сопоставления данных ЛДГ и МТТ-тестов, наиболее эффективными во всех изученных моделях *in vitro* оказался наномицеллярный комплекс КЛК, поэтому он был выбран для дальнейшего изучения механизмов его действия и оценки эффективности в условиях моделирования ротенон-индуцированного паркинсонизма на клеточной культуре и животных. Ротенон применяется повсеместно в сельском хозяйстве в качестве пестицида широкого спектра и ихтиоцида. Он часто используется для моделирования паркинсонизма *in vitro* и *in vivo* в связи с тем, что вызывает избирательную гибель дофаминергических нейронов и приводит к развитию паркинсонической симптоматики у животных.

***Влияние наномицеллярного комплекса КЛК на количество клеток, погибших по пути апоптоза и/или некроза в условиях ротенон-индуцированного паркинсонизма.*** Инкубация клеток с 20 мкМ ротенона в течение 3 ч приводит к увеличению количества клеток, погибших по пути некроза. Так, если в интактных клетках количество окрашенных PI клеток в поле составляло в среднем  $9,3 \pm 0,9\%$  от общего количества клеток в поле, то в клетках с ротеноном –  $22,9 \pm 1\%$ , что в 2,5 раза больше ( $p < 0,001$ ). Одновременное с ротеноном добавление в культуральную среду 0,5 мМ комплекса КЛК снижает данный показатель практически до уровня интактных клеток (до  $12,2 \pm 1,3\%$  от общего количества клеток в поле,  $p < 0,01$ ) (рис. 4).

Методом флуоресцентной окраски прикрепленной культуры аннексином и PI было показано, что 3х-часовая инкубация с 20 мкМ ротеноном приводит к увеличению интенсивности флуоресценции как аннексина (на  $11,3 \pm 1,7\%$ ,  $p < 0,001$ ), так и PI (на  $24,1 \pm 1,1\%$ ,  $p < 0,001$ ), что свидетельствует о гибели клеток как по пути апоптоза, так и некроза. Внесение в инкубационную среду исследуемых соединений в концентрации 0,5 мМ совместно с 20 мкМ ротенона приводило к снижению уровня флуоресценции аннексина (до значений интактных клеток) и PI – относительно клеток с ротеноном. При этом уровень флуоресценции PI эффективнее всего снижался под действием КЛК (до  $111,7 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,001$ ).

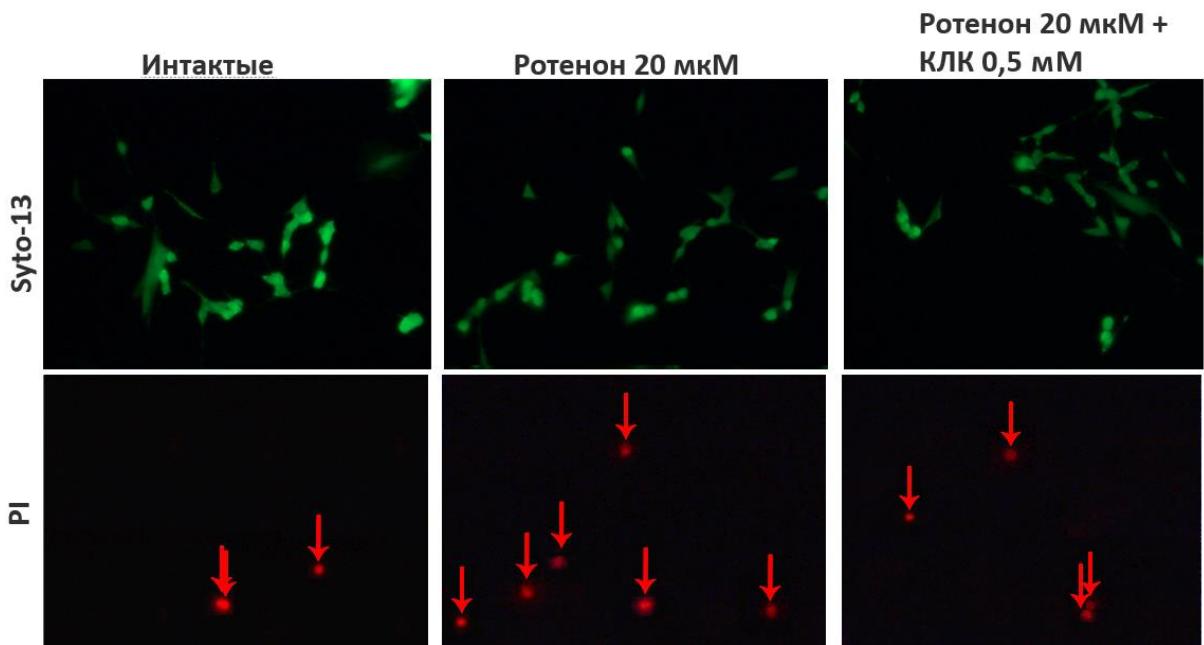


Рисунок 4 – Влияние 20 мкМ ротенона и 0,5 мМ комплекса КЛК спустя 3 ч инкубации на гибель клеток, оцененную методом флуоресцентной окраски красителем иодидом пропидия (PI, красный). Зеленая окраска – краситель цитоплазмы клеток Syto13. Красными стрелками помечены окрашенные PI (погибшие) клетки. Масштаб микрофотографии 1:200.

Таким образом, количество погибших клеток в условиях токсического действия ротенона, оцениваемое двумя взаимодополняемыми методами, оказалось сопоставимым. Все изученные соединения (карнозин, ЛК, смесь ЛК и карнозина, КЛК) снижали уровень гибели клеток по пути апоптоза. КЛК наиболее эффективно препятствовал гибели клеток по пути некроза.

**Влияние комплекса КЛК на уровень АФК в условиях ротенон-индуцированного ОС.** Динамику интенсивности флуоресценции DCF, характеризующей уровень АФК, при одновременном добавлении 20 мкМ ротенона и исследуемых соединений в концентрации 0,5 мМ (КЛК, карнозин, ЛК, смесь ЛК с карнозином) оценивали в прикрепленной культуре на микропланшетном ридере после инкубации в течение 5, 15, 30 мин, 1, 2, 3 ч (рис. 5).

Во всех временных точках при добавлении ротенона повышается уровень АФК относительно интактных клеток, достигая своего пика на 15 мин. Комплекс КЛК на 5 и 15 минуте снижал количество АФК относительно клеток с ротеноном на  $21,3 \pm 3,2\%$  и  $39,6 \pm 3,1\%$  ( $p < 0,001$ ), а к 30 мин и далее до 3 ч – до уровня АФК в интактных клетках. Таким образом, показано, что наиболее интенсивно АФК в клетках образуются в первые 20 минут после добавления ротенона. При этом наиболее эффективно уровень АФК снижает наномицелярный комплекс КЛК

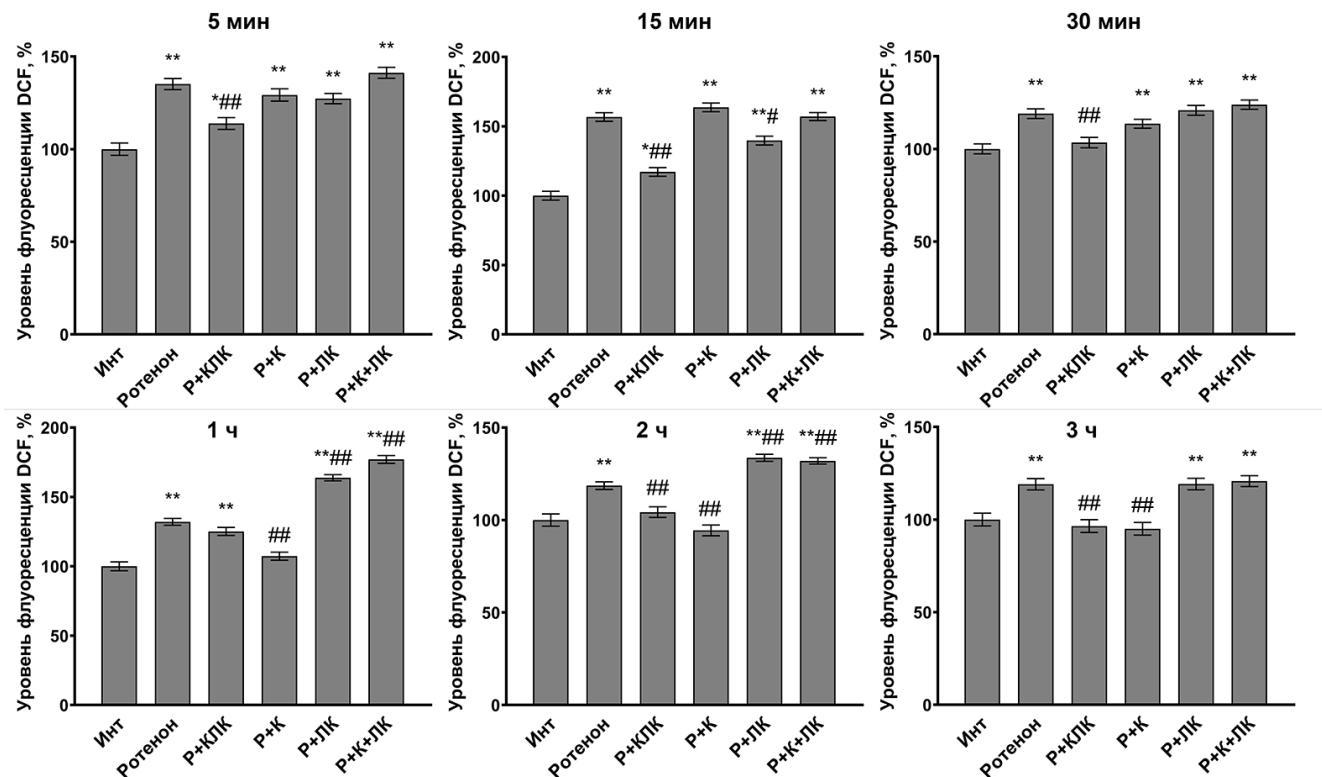


Рисунок 5 – Влияние комплекса КЛК, карнозина (К), ЛК и их смеси (К+ЛК) в концентрации 0,5 мМ на динамику интенсивности флуоресценции DCF через 5, 15, 30 мин и 1, 2, 3 ч после их одновременного добавления с 20 мкМ ротенона; в % от интенсивности флуоресценции интактных клеток. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$  по отношению к контрольным клеткам; # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,001$  по отношению к клеткам с ротеноном.

**Влияние комплекса КЛК на уровень дофамина и его метаболитов в условиях ротенон-индукционного паркинсонизма.** Через 5 ч инкубации клеток с 20 мкМ ротенона в лизатах наблюдается увеличение содержания ДА на  $53,4 \pm 5,5\%$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 6). Также меняется и содержание его метаболитов: гомованилиновая кислота (ГВК) и 3-метокситирамин (3-МТ) увеличиваются в 9,3 и 27,9 раз, соответственно.

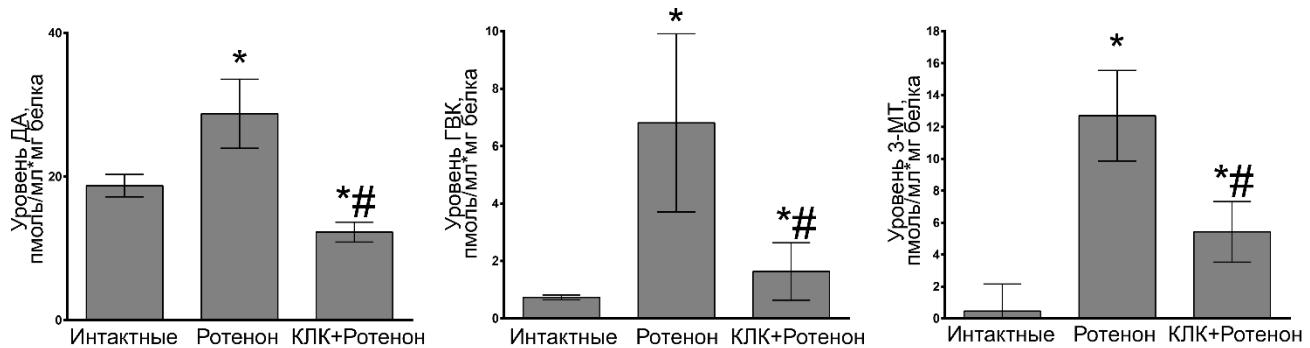


Рисунок 6 – Влияние 0,5 мМ комплекса КЛК через 5 ч инкубации с 20 мкМ ротенона на уровень ДА, ГВК, 3-МТ в клеточной культуре, в пмоль/мл\*мг белка в пробе. \* –  $p < 0,05$  по отношению к контрольным клеткам; # -  $p < 0,05$  - по отношению к клеткам с ротеноном.

Добавление в культуральную среду 0,5 мМ комплекса КЛК одновременно с ротеноном приводит к снижению уровня ДА до  $65,4 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ ) относительно интактных клеток (принятых за 100%), содержание ГВК и 3-МТ также снижается относительно клеток с ротеноном в 4,2 и 2,3 раза, соответственно. Кроме того, сравнение действия комплекса КЛК с карнозином, ЛК и их смесью в равных концентрациях (0,5 мМ) на уровень ДА в условиях токсического действия 20 мКМ ротенона показало, что только КЛК снижает уровень ДА.

Таким образом, показана способность комплекса КЛК влиять на метаболизм ДА в системе *in vitro*. Механизм действия комплекса на уровень медиаторов-моноаминов требует дальнейшего изучения. Можно предположить, что данный эффект связан с высокой антиоксидантной активностью комплекса и его способностью связывать токсичные продукты метаболизма ДА.

### **Протекторное действие наномицеллярного комплекса КЛК в модели ранней стадии паркинсонизма у крыс, индуцированного интраназальным введением МРТР**

**Влияние комплекса КЛК на содержание катехоламинов в стриатуме.** Показано, что на 29 день в стриатуме экспериментальных животных, получавших МРТР и исследуемые препараты, не выявляются изменения в уровне нейромедиаторов: ДА, норадреналина и серотонина. Однако у экспериментальных животных обнаружаются значимые изменения в содержании метаболитов ДА – диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и ГВК (рис. 7), но не 3-МТ. Содержание ДОФУК снижалось на  $45,6 \pm 2,7\%$ ,  $p < 0,01$ , а ГВК на  $24 \pm 4,7\%$ ,  $p < 0,01$  по отношению к интактным животным.

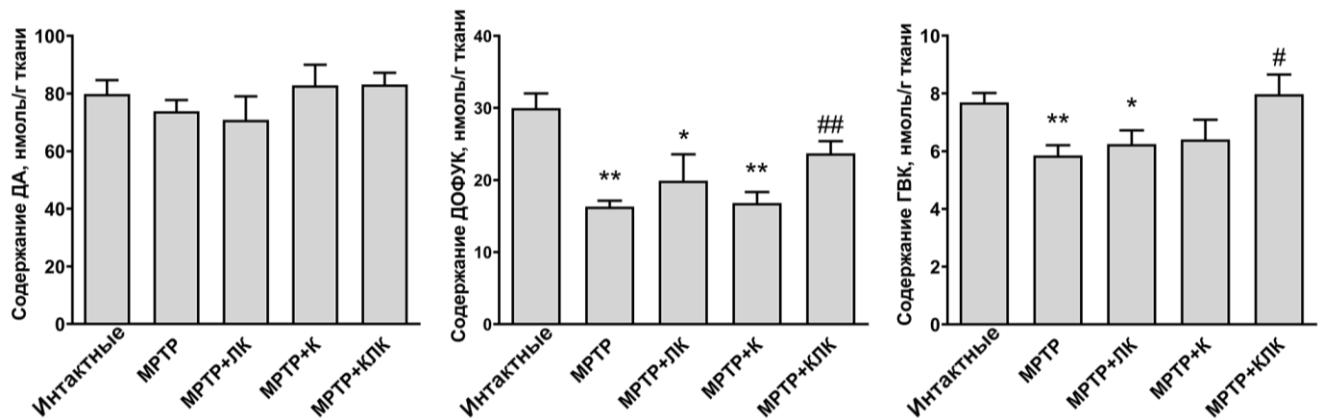


Рисунок 7 – Влияние ЛК, карнозина (К) и комплекса КЛК на содержание ДА, ДОФУК и ГВК в стриатуме крыс на 29 день после интраназального введения МРТР. \* – отличия от интактных с  $p < 0,05$ ; \*\* – с  $p < 0,01$ ; # – отличия от животных, получивших МРТР с  $p < 0,05$ ; ## – с  $p < 0,01$ .

Из всех изученных соединений только комплекс КЛК эффективно восстанавливал уровень метаболитов ДА, что выражалось в повышении ДОФУК на  $24,7 \pm 5,6\%$  ( $p < 0,01$ ) и ГВК – до значений у интактных животных ( $p < 0,05$ ), по отношению к животным, получавшим МРТР.

**Влияние комплекса КЛК на антиоксидантный статус мозга.** Методом железо-индукционной ХЛ было показано, что на 29 день после введения МРТР активность

антиоксидантной системы (t) в лобных долях мозга крыс (на  $32,5 \pm 6,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) снижена по отношению к интактным животным (рис. 8). Двукратное внутрибрюшинное введение карнозина, ЛК и комплекса КЛК (на 14 и 15 день после МРТР) увеличивало данный показатель относительно животных, получавших МРТР (карнозин – на  $38,8 \pm 4,4\%$ ,  $p < 0,05$ ; ЛК на  $28,9 \pm 4,8\%$ ,  $p < 0,05$  и комплекс КЛК на  $35,0 \pm 6,7\%$ ,  $p < 0,05$ ), восстанавливая его до значений у интактных животных.

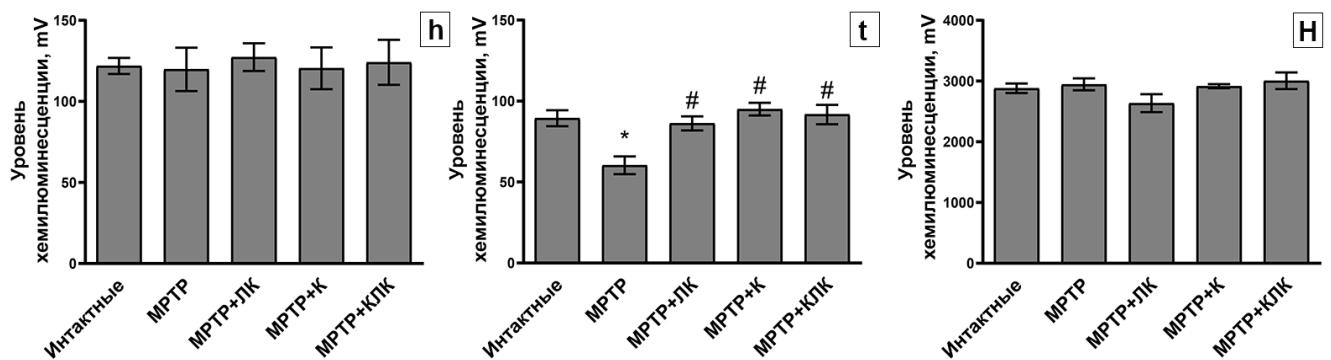


Рисунок 8 – Влияние липоевой кислоты (ЛК), карнозина (К) и комплекса КЛК на уровень предобразованных гидроперекисей (h), общую активность антиоксидантной системы (t) и максимальную интенсивность ХЛ (H) в лобных долях экспериментальных животных на 29 день после интраназального введения МРТР. \* – отличия от интактных с  $p < 0,01$ ; # – отличия от животных, получивших МРТР с  $p < 0,01$ .

Таким образом, из всех исследованных соединений только комплекс КЛК нормализовал показатели метаболизма ДА, в то время как его компоненты по отдельности подобного эффекта не проявили. Впервые на модели ранней стадии паркинсонизма с длительным пресимтоматическим периодом, индуцированного интраназальным введением МРТР, показаны нарушения в работе антиоксидантной системы в лобных долях – зоне мозга, прилежащей к обонятельным луковицам – месту входа токсина, даже на отдаленных сроках. При этом двукратное внутрибрюшинное введение карнозина, ЛК и комплекса КЛК на 14 и 15 день после МРТР нормализует показатель общей антиоксидантной активности ткани мозга.

#### **Протекторное действие комплекса КЛК в модели поздней стадии паркинсонизма у крыс, индуцированного хроническим подкожным введением ротенона**

**Влияние комплекса КЛК на плотность распределения нейронов в черной субстанции головного мозга экспериментальных животных.** У животных, получавших только ротенон, в исследуемой области кЧС плотность нейронов составляла в среднем  $304,0 \pm 10,8$ , в группе, получавшей в дополнение комплекс КЛК в дозе 25 мг/кг она составляла в среднем  $399,8 \pm 15,0$  (что выше на 24%) (рис. 9). При этом у интактных животных данный показатель оставался выше –  $503,7 \pm 17,0$ .

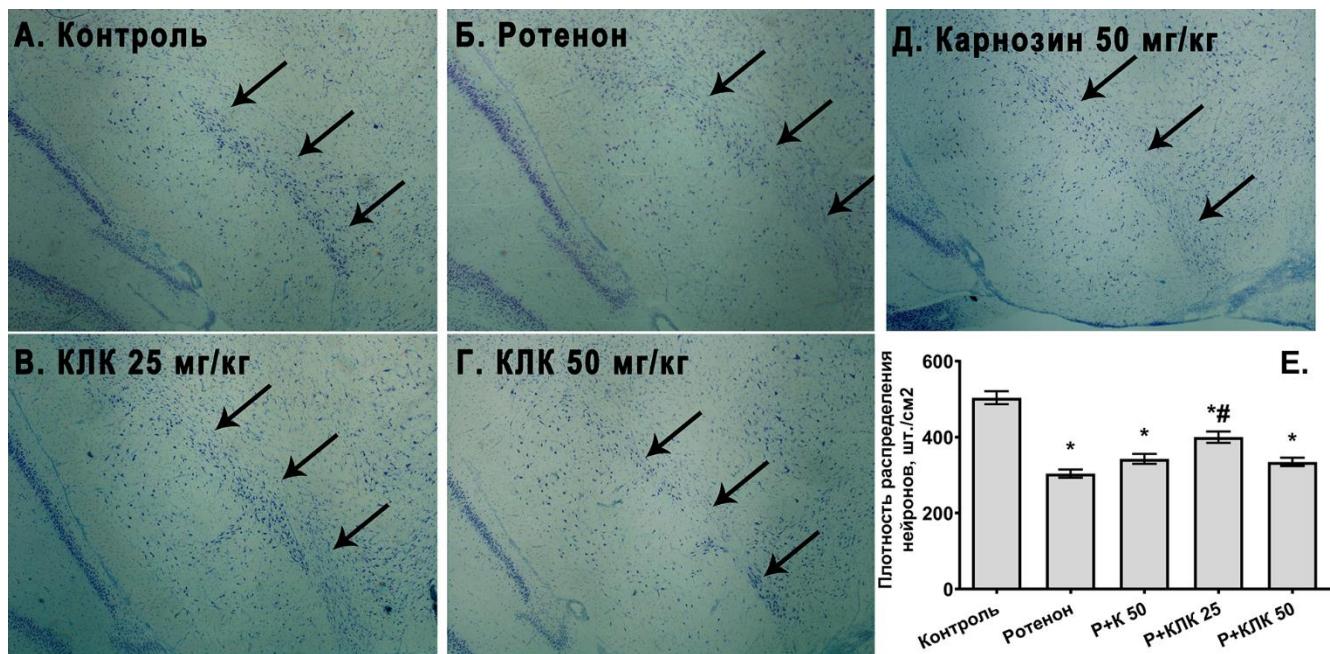


Рисунок 9 – Фотографии окрашенных по методу Ниссля нейронов в кЧС (помечена стрелками), срез мозга: А – интактного животного; Б – получавшего ротенон; В – получавшего ротенон и комплекс КЛК в дозе 25 мг/кг массы тела; Г – получавшего ротенон и комплекс КЛК в дозе 50 мг/кг массы тела; Д – получавшего ротенон и карнозин в дозе 50 мг/кг массы тела; Е – результаты подсчета плотности распределения нейронов в кЧС. \* – отличия от интактных с  $p < 0,0001$ ; # – отличия от животных, получивших ротенон с  $p < 0,0001$ .

Таким образом, анализ плотности распределения нейронов в кЧС выявил её достоверное увеличение в группе животных, получавших комплекс КЛК в дозе 25 мг/кг ( $p < 0,0001$ ) относительно животных, получавших только ротенон, что свидетельствует о прямом нейропротекторном эффекте комплекса.

**Влияние комплекса КЛК на содержание дофамина и его метаболитов.** В стриатуме животных, получавших ротенон, на 18 день уровень ДА снижался на 58,6% относительно интактной группы, при этом увеличивались интегральные показатели метаболизма ДА – соотношение ДОФУК/ДА в 3,3-раза и соотношение ГВК/ДА в 2,9 раза (рис. 10). Введение 25 мг/кг массы тела комплекса КЛК совместно с ротеноном повышало уровень ДА в 2,2 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с группой животных, получавших токсин, а также нормализовало показатели оборота ДА, что свидетельствует о его нейропротекторном эффекте.

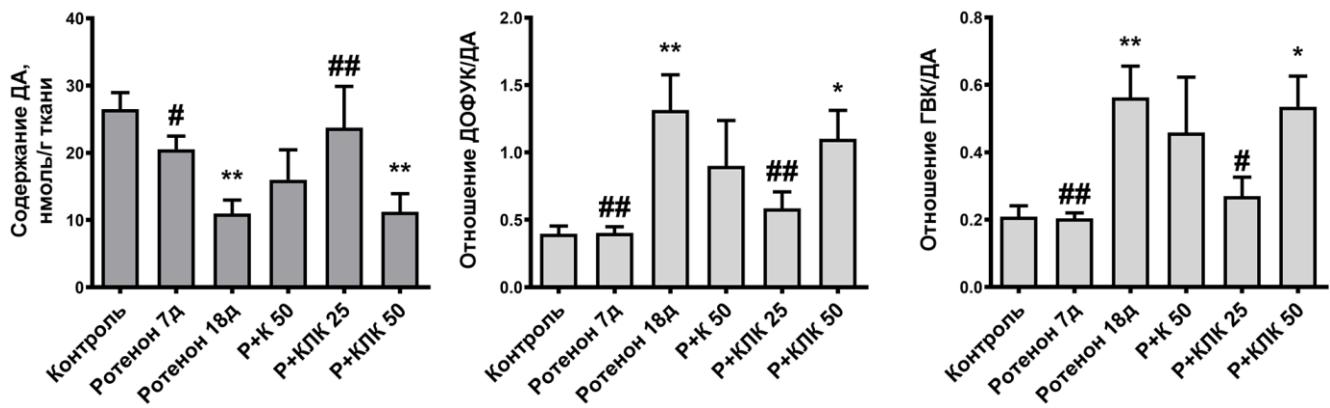


Рисунок 10 – Влияние введения ротенона в течение 7 и 18 дней, а также совместного с ротеноном введения карнозина (50 мг/кг) и комплекса КЛК (25 и 50 мг/кг) в течение 18 дней на содержание ДА и на соотношения ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в стриатуме экспериментальных животных. \* – отличия от интактных с  $p < 0,05$ , \*\* – с  $p < 0,001$ ; # – отличия от животных, получивших ротенон с  $p < 0,05$ , ## – с  $p < 0,001$ .

**Влияние комплекса КЛК на антиоксидантный статус мозга.** Введение ротенона в течение 18 дней снижало общую антиоксидантную активность на  $33,0 \pm 7,6\%$  и увеличивало максимальную интенсивность окисления ткани лобной доли больших полушарий головного мозга на  $5,6 \pm 1,6\%$  относительно интактной группы (рис. 11). Введение всех исследуемых соединений увеличивало общую антиоксидантную активность ткани: карнозин – на  $37,8 \pm 4,5\%$  ( $p = 0,009$ ), КЛК в дозе 25 мг/кг – на  $59,3 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,0001$ ), КЛК в дозе 50 мг/кг – на  $79,2 \pm 4,6\%$  ( $p < 0,0001$ ), относительно животных, получавших только ротенон; однако, только комплекс КЛК в дозе 25 мг/кг массы тела снижал максимальную интенсивность ПОЛ до уровня у интактных животных.

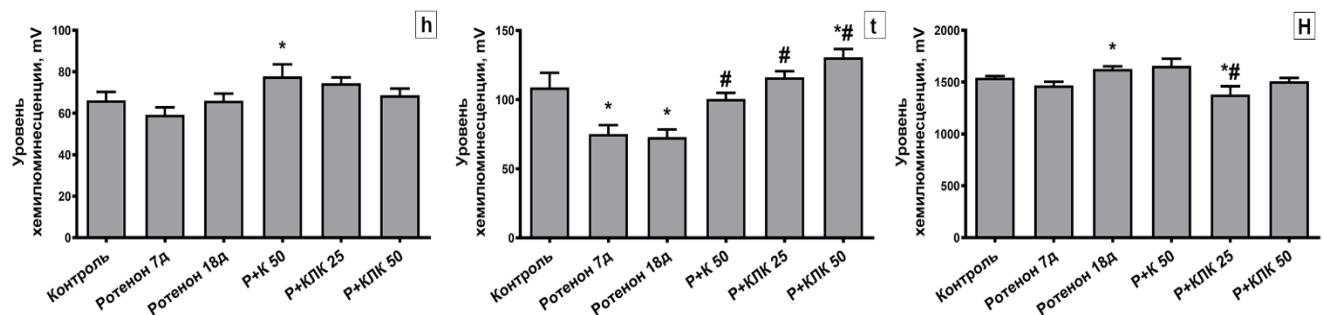


Рисунок 11 – Влияние введения ротенона в течение 7 и 18 дней, а также совместного с ротеноном введения карнозина (50 мг/кг) и комплекса карнозин-липоевая кислота (КЛК) (25 и 50 мг/кг) в течение 18 дней на уровень предобразованных гидроперекисей (h), общую активность антиоксидантной системы (t) и максимальную интенсивность ХЛ (Н), мВ в гомогенатах лобных долей экспериментальных животных. \* – отличия от интактных с  $p < 0,05$ ; # – отличия от животных, получивших ротенон с  $p < 0,05$ .

Таким образом, показан нейропротекторный и антиоксидантный эффект комплекса КЛК как на ранней (пресимптоматической), так и на поздней (симптоматической) стадии паркинсонизма.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Новые соединения и комплексы карнозина ЛипК, STK и СцК проявляют абсолютную устойчивость к действию сывороточной карнозиназы, наномицеллярный комплекс КЛК подвергается ферментативному гидролизу на 20% медленнее карнозина. Все изученные новые соединения и комплексы карнозина способны нейтрализовать гидроперекиси липидов и обладают прямой антиоксидантной активностью.

2. На культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, показано, что:

2.1. Экологические факторы, такие как токсичные загрязняющие окружающую среду вещества: тяжелый металл кадмий и пестициды ротенон и паракват способны нарушать гомеостаз дофаминергических клеток мозга и повышать их гибель в культуре;

2.2. Отсутствие цитотоксического эффекта у всех новых соединений и комплексов карнозина в диапазоне физиологических для нейрональной культуры концентраций (до 1 мМ);

2.3. Нейропротекторное действие наномицеллярного комплекса КЛК в условиях эндоэкологического повреждения токсинами: пестицидами ротенононом и параквatom, тяжелым металлом кадмием, 6-OHDA, MPP+ и AAPN; STK – в условиях токсичности 6-OHDA, ротенона, параквата, AAPN и кадмия; ЛипК – в условиях токсичности ротенона и MPP+; СцК – в условиях токсического действия AAPN, кадмия и параквата;

2.4. Наномицеллярный комплекс КЛК препятствует гибели клеток по пути некроза и апоптоза, а также эффективно снижает уровень АФК и нормализует уровень катехол- и индоламинов и их метаболитов в условиях ротенон-индукции ОС.

3. В экспериментах, проведенных на крысах линии Вистар, показано:

3.1. В модели ранней (премоторной) стадии паркинсонизма, индуцированного однократным интраназальным введением МРТР, двукратное внутрибрюшинное введение комплекса КЛК (100 мг/кг массы тела) на 14 и 15 день после нейротоксина, нормализует показатели метаболизма ДА и серотонина и общую антиоксидантную активность ткани мозга;

3.2. В модели поздней (моторной) стадии паркинсонизма, индуцированного хроническим под кожным введением пестицида ротенона в течение 18 дней, введение животным комплекса КЛК (25 мг/кг массы тела) совместно с ротеноном повышает плотность распределения нейронов на 24% в кЧС, уровень ДА в стриатуме - в 2,2 раза по сравнению с группой животных, получавших токсин; а также нормализует показатели оборота ДА, что свидетельствует о нейропротекторном эффекте КЛК.

3.3. Нейропротекторный эффект комплекса КЛК обусловлен способностью увеличивать общую антиоксидантную активность и снижать максимальную интенсивность ПОЛ в ткани мозга, по сравнению с животными, получавшими только ротенон.

### **Практические рекомендации**

Полученные результаты могут служить основанием для разработки биологически активных добавок, предназначенных для профилактики паркинсонизма у лиц, находящихся в группе риска: в первую очередь работников сельского хозяйства и промышленного производства средств защиты растений, контактирующих с пестицидами, и работников металлургической промышленности. Полученные результаты по оценке нейропротекторной активности наномицеллярного комплекса КЛК на модели поздней симптоматической стадии паркинсонизма могут служить основанием для разработки лекарственного препарата, применяемого в качестве дополнения к базовой терапии пациентов с БП.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. Стволинский С. Л., Прозоровский В. Н., Бережной Д. С., **Куликова О.И.**, Абаймов Д.А., Федорова Т.Н. Наномицеллярный комплекс липоевой кислоты с карнозином, обладающий антиоксидантной активностью: исследование в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2016. - Т. 19. - № 11. - С. 3-9.
2. **Куликова О.И.**, Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Орлова В.С, Иноземцев А.Н. Карнозин предотвращает развитие окислительного стресса в условиях токсического действия кадмия. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. - 2016. - № 4. - С. 66-71.
3. Федорова Т.Н., **Куликова О.И.**, Стволинский С.Л., Орлова В.С. Протекторное действие (S)-тролокс-карнозина на культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях токсичности тяжелых металлов // Нейрохимия. - 2016. - Т. 33 . - № 1 . - С. 63-69
4. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., **Куликова О.И.**, Коновалова Е.В., Левачева И.С., Самсонова О., Баковский У. Эффективность нейропротекторного действия новых производных природного антиоксиданта карнозина в условиях окислительного стресса *in vitro* и *in vivo* // Анналы клинической и экспериментальной неврологии - 2016. - Т. 10 . - № 1 . - С. 47-52.
5. **Kulikova O.I.**, Fedorova T.N., Lopachev A.V., Orlova V.S., Grachev V.A. Effects of Antioxidants on the Viability of the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Culture under the Conditions of Heavy-Metal Toxicity // Biology and medicine. - 2016. - Vol. 8. - № 4. Article 305.

6. **Kulikova O.I.**, Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Orlova V.S., Fedorova T.N. Neuroprotective effect of the carnosine – α-lipoic acid nanomicellar complex in a model of early-stage Parkinson's disease // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. - 2018. - Vol. 95. - P. 254-259.
7. Стволинский С.Л., Антонова Н.А., **Куликова О.И.**, Лопачёв А.В., Абаймов Д.А., Аль-Байдани И., Лопачёва О.М., Фёдорова Т. Н., Каплун А.П., Сорохоумова Г. М. Липоилкарнозин: синтез, изучение физико-химических и антиоксидантных свойств, биологическая активность // *Биомедицинская химия*. - 2018. - Т. 12. - № 4. - С. 268-275.
8. Бережной Д.С., **Куликова О.И.**, Федорова Т.Н., Иноземцев А.Н., Стволинский С.Л. Нейрохимические и поведенческие нарушения в модели ранней стадии паркинсонизма у крыс Вистар при интраназальном введении МФТП // *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*. - 2018. - Т. 68. - № 4. - С. 1-10.
9. Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., **Kulikova O.I.**, Abaimov D.A., Fedorova T.N. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions // *Amino Acids*. 2018. - Vol. 51. - № 1. - P. 139-150. doi: 10.1007/s00726-018-2667-7.
10. **Куликова О.И.**, Федорова Т.Н., Кузнецов В.И., Орлова В.С. Экзогенные факторы риска возникновения болезни Паркинсона // *Экология человека*. - 2019. - № 1. - С. 34–39.
11. **Куликова О.И.**, Федорова Т.Н., Орлова В.С. Моделирование болезни паркинсона с помощью экзогенных нейротоксинов // *Токсикологический вестник*. - 2019. - №2. - С. 9-15.
12. Бережной Д.С., Федорова Т.Н., **Куликова О.И.**, Ставровская А.В., Абаймов Д.А., Гущина А.С., Ольшанский А.С., Воронков Д.Н., Стволинский С.Л. Действие карнозина и липоевой кислоты в модели поздней стадии паркинсонизма у крыс // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. - 2019. - №5. - С. 49-55. D doi: 10.24075/vrgmu.2019.060.
13. **Kulikova O.I.**, Stvolinsky S.L., Migulin V.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Lopacheva O.M., Kulichenkova K.N., Lopachev A.V., Trubitsina I.E., Fedorova T.N. A new derivative of acetylsalicylic acid and carnosine: synthesis, physical and chemical properties, biological activity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2020. - Vol. 28. - № 1. - P. 119-130. doi: 10.1007/s40199-019-00323-x.
14. Troshev D., **Kulikova O.**, Berezhnoy D., Abaimov D., Muzychuk O., Nalobin D., Stvolinsky S., Fedorova T. The dynamics of nigrostriatal system damage and neurobehavioral changes in the rotenone rat model of Parkinson's disease // *Brain Research Bulletin*. - 2021. - Vol. 173. - P. 1-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2021.04.006.

Сборники и тезисы (за последние 5 лет):

15. Berezhnoy D.S., Fedorova T.N., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., **Kulikova O.I.**, Belousova M.A., Abaimov D.A., Morozova M.P., Gavrilova S.A., Medvedev

O.S. / Carnosine as an effective neuroprotector in ischemic stroke and potential neuromodulator in normal conditions: new mechanisms of action in the brain // International Congress on Carnosine and Anserine (ICCA), 2017.

16. **Kulikova O.I.**, Orlova V.S. Environmental factors as modulators of neurodegenerative disorders developmen // Youth of XXI Century in Scientific, Cultural and Educational Environment: New Values, Challenges, Perspectives: сборник научных трудов Международной молодежной научно-практической конференции. Ноябрь 2017 г.: в 2 ч. - Vol. 1. - РУДН Москва, 2017. - P. 32–34.

17. **Куликова О.И.**, Орлова В.С. Роль тяжелых металлов в развитии болезни паркинсона. Актуальные проблемы экологии и природопользования: сборник научных трудов XIX Международной научно-практической конференции. Москва, 26-28 сентября 2018 г. - Москва: РУДН, 2018. – С. 223-230

#### Патенты:

1. № RU 2647435 от 15.03.2018 «Мицелярный комплекс липоевой кислоты с карнозином для защиты млекопитающих от окислительного стресса». Авторы: Стволинский С.Л., Прозоровский В.Н., Федорова Т.Н., Бережной Д.С., **Куликова О.И.**, Логвиненко А.А.

2. № RU 2694061 от 9.07.2019 «Средство, обладающее антиагрегантной, цитопротекторной и антиоксидантной активностью». Авторы: Танашян М.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мигулин В.А., Шабалина А.А., Трубицына И.Е., Лопачев А.В., **Куликова О.И.**, Абаймов Да.

#### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

БП – Болезнь Паркинсона	MPP+ – (1-метил-4-фенилпиридиний)
кЧС – компактная часть черной субстанции	ААРН – 2,2'-азобис[2-метилпропионамидин]
ДА – дофамин	дигидрохлорид
ОС – окислительный стресс	МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-
АФК – активные формы кислорода	дифенилтетразолийбромид
ПОЛ – перекисное окисление липидов	МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-
STK – S-Тролокс-L-карнозин	тетрагидропиридин
ЛК – липоевая кислота	ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛипК – натриевая соль липоилкарнозина, липоилкарнозин	PI – йодид пропидия
СК – салициловая кислота	ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
СцК – салицил-карнозин	ЭД – электрохимическая детекция
КЛК – наномицеллярный комплекс карнозина с α-липоевой кислотой	ХЛ – Fe <sup>2+</sup> -[железо]-индукционная хемилюминесценция
6-OHDA – 6-гидроксидофамин	ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота

ГВК – гомованилиновая кислота

3-МТ – 3-метокситирамин

**АННОТАЦИЯ****Куликова Ольга Игоревна (Россия)****Нейропротекторная эффективность новых соединений и комплексов карнозина в моделях экспериментального паркинсонизма, индуцированного экзогенными нейротоксинами**

В диссертационной работе проведено комплексное исследование антиоксидантных свойств и нейропротекторной эффективности новых соединений и комплексов карнозина (S-тролокс-карнозин, салицил-карнозин, липоилкарнозин и наномицеллярный комплекс карнозин-липоевая кислота) на клеточно-молекулярном уровне в моделях окислительного стресса и токсин-индукции паркинсонизма с оценкой наиболее эффективного из них – комплекса карнозин-липоевая кислота – как в экспериментах *in vitro* (на культуре нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу), так и в экспериментальных моделях паркинсонизма на животных (ранней и поздней стадий паркинсонизма у крыс). Оценка нейропротекторного эффекта исследуемых соединений выявила их способность повышать жизнеспособность клеток в условиях действия ряда нейротоксинов и тяжелого металла кадмия. Впервые показано, что комплекс КЛК обладает высокой антиоксидантной и нейропротекторной активностью, улучшает нейрохимические характеристики мозга животных как в условиях моделирования ранней, так и поздней стадии паркинсонизма.

**SUMMARY****Olga Igorevna Kulikova (Russia)****The neuroprotective efficacy of new compounds and carnosine complexes in models of experimental exogenous neurotoxin-induced parkinsonism**

In the present thesis, a thorough investigation of the antioxidant properties and antioxidant effectiveness of new carnosine-based compounds and complexes (S-trolox-carnosine, salicyl-carnosine, lipoylcarnosine and a nanomicellar carnosine-lipoic acid complex) is presented. All substances have been tested on the cellular-molecular level in oxidative stress models, as well as toxin-induced parkinsonism. The carnosine-lipoic acid complex (CLA), which was the most effective, was further tested both *in vitro* (on human SH-SY5Y neuroblastoma cell culture differentiated into a dopaminergic phenotype) and *in vivo* on experimental models of rodent parkinsonism (early and late parkinsonism stages in rats). Evaluation of the neuroprotective effect of the studied compounds revealed their ability to increase cell viability under the action of a number of neurotoxins and heavy metal cadmium. It was found the CLA complex displays high levels of antioxidant and neuroprotective activity, and improves neurochemical characteristics of animal brain in models of both early and late stages of parkinsonism.