

# Эффективность нейропротекторного действия карнозина в составе нанолипосом и S-тролокс-карнозина в условиях окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*

Т.Н. Федорова, С.Л. Стволинский, О.И. Куликова, Е.В. Коновалова, И.С. Левачева, О. Самсонова, У. Баковский

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва);

Филиппс Университет, Институт фармацевтической технологии (Марбург, Германия)

*В экспериментах in vivo на модели острой гипобарической гипоксии у грызунов и в опытах in vitro на нейрональных культурах было исследовано протекторное действие карнозина в составе нанолипосом и нового синтетического соединения S-тролокс-карнозина в условиях окислительного стресса (ОС). Показана способность новых соединений карнозина повышать устойчивость животных к острой гипобарической гипоксии, защищая мозг от окислительного повреждения. Этот эффект сопровождается сохранностью приобретенных навыков в водном лабиринте Морриса, который, по-видимому, обусловлен увеличением эффективности антиоксидантной системы мозга. При индукции ОС пероксидом водорода, спермином, акролеином или кадмием в суспензии гранулярных клеток мозжечка мышей линии SAMPI, первичной культуре нейронов мозжечка крыс и культуре клеток PC-12, дифференцированных по нейрональному типу, выявлена способность карнозина в составе нанолипосом и S-тролокс-карнозина подавлять рост активных форм кислорода и снижать гибель клеток, повышая их жизнеспособность. Результаты исследования демонстрируют высокое антигипоксическое и антиоксидантное действие новых соединений карнозина и открывают перспективы для разработки и применения препаратов на их основе в неврологии.*

**Ключевые слова:** S-тролокс-карнозин, карнозин в составе нанолипосом, острая гипобарическая гипоксия, окислительный стресс, нейрональные клеточные культуры, антиоксидантная защита.

## Введение

Карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) является эффективным природным протектором клеток и тканей от окислительного стресса (ОС). Эффективность карнозина показана на различных экспериментальных моделях заболеваний ЦНС (гипоксия/ишемия головного мозга, болезнь Паркинсона и др.) и обусловлена в первую очередь его прямым антиоксидантным действием, а также свойствами модулятора супероксиддисмутазы и NMDA-рецепторов, антиглицирующего агента, хелатора ионов металлов, молекулярного шаперона [1, 4, 5, 10].

Экспериментальные исследования послужили основанием для использования карнозина как биологически активной пищевой добавки [9]. В пилотных клинико-биохимических исследованиях было показано, что карнозин повышает эффективность базисной терапии при болезни Паркинсона [6]. Однако для достижения стабильного протекторного эффекта требуется введение высоких доз карнозина, чтобы компенсировать его гидролиз под действием специфических дипептидаз – тканевой и сывороточной карнозиназ [5, 11]. Повысить эффективность карнозина можно путем его модификации, обеспечивающей устойчивость дипептида к действию карнозиназ, или связав его в структуру, недоступную для ферментов.

В связи с этим поиск способов повышения эффективности карнозина привел к созданию японскими коллегами (Nagai Chemicals, Ltd) нового синтетического соединения, представляющего собой комбинацию карнозина с водорастворимым аналогом витамина E – тролоксом – (S)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонил- $\beta$ -аланил-L-гистидин (S-тролокс-карнозин, S-ТК) [12].

S-ТК характеризуется высокой устойчивостью к карнозиназе, сохраняя при этом основные биологические свойства карнозина [15]. Внесение этого соединения в пищевой рацион *Drosophila melanogaster* приводило к большему увеличению продолжительности их жизни по сравнению с карнозином, что указывает на его эффективное геропротекторное действие [16].

Другим подходом к решению этой задачи может быть включение карнозина в наноструктурные конструкции, наиболее распространенными среди которых являются нанолипосомы. В последние годы, как в России, так и за рубежом, проводятся исследования возможности применения наноконструкций на основе фуллеренов, ферригидрита, синтетических полимеров, липосом и других наноконструкций. Принципиально значимыми являются данные о способности наноструктур преодолевать гематоэнцефалический барьер и проявлять заданные свойства при их адресной доставке в мозг. Физико-химические особенности нано-

размерных структур делают эти конструкции перспективными для создания новых лекарственных препаратов. Уже утвержден ряд липосомальных препаратов для лечения онкологических заболеваний и различных инфекций [21]. Выявлена перспектива использования лекарственных препаратов, включенных в состав липосом при заболеваниях ЦНС [20].

В связи с этим оценка протекторного действия новых биологически активных композиций в условиях моделирования патологических процессов в мозге, развивающихся под действием многофакторного ОС, является актуальной задачей.

**Цель** настоящей работы – исследовать протекторную эффективность карнозина, включенного в состав фосфолипидных наноструктур и S-Тролокс-карнозина на биологических моделях *in vitro* и *in vivo* в условиях ОС.

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** В опытах *in vitro* использовали культуру феохромоцитомы крысы PC-12-D4, дифференцированную по нейрональному пути, быстрорастущую клеточную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC®, США) и суспензию гранулярных клеток мозжечка, выделенных из 10–12 дневных мышей.

Исследования *in vivo* выполнены на крысах линии Wistar и мышцах линии SAMR1. Все эксперименты проводились с соблюдением регламента работы с экспериментальными животными [22].

**Исследуемые соединения.** В работе были использованы: карнозин (Hamari Chemicals Ltd, Япония), спермин (Sigma Aldrich, Switzerland), карнозин (100 мМ) в составе нанолипосом был предоставлен И.С. Левачевой (Philipps-Universität Marburg, Department of Pharmaceutics & Biopharmacy, ФРГ), S-тролокс-карнозин был синтезирован и предоставлен для экспериментальных исследований фирмой Hamari Chemicals Ltd.

**Окислительный стресс *in vitro*.** Уровень активных форм кислорода (АФК) и долю мертвых клеток в клеточной популяции определяли методом проточной цитофлуориметрии [7, 18]. Для измерения внутриклеточного уровня АФК использовали флуоресцентный краситель DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетат,  $\lambda_{ex} = 485$  нм,  $\lambda_{em} = 535$  нм). Определение доли мертвых клеток проводили с помощью флуоресцентного красителя йодида пропидия (PI,  $\lambda_{ex} = 485$  нм и  $\lambda_{em} = 610$  нм). Суспензию клеток, окрашенную PI и DCFH<sub>2</sub>-DA, анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (BD Biosciences, США). Данные обрабатывали с помощью программы ModFit LT™ (BD, США).

**Оценку жизнеспособности клеток** проводили по МТТ-тесту. Метод МТТ основан на восстановлении живыми клетками желтого 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромидом (МТТ) в синие кристаллы формазана [3]. Спектрофотометрически измеряли оптическую плотность раствора образовавшегося формазана в ДМСО с использованием планшетного ридера Synergy H4 (BioTek).

**Антиоксидантную активность изучаемых соединений** оценивали на модели Fe<sup>2+</sup>-индуцированной хемилуминесценции

липопротеинов (ХЛ-тест) [2]. Метод основан на измерении параметров хемилуминесценции в условиях окисления ионами двухвалентного железа суспензии липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛП), выделенных из сыворотки здоровых лиц. В работе регистрировали следующие параметры ХЛ: h – быстрая вспышка ХЛ, отражающая стационарный уровень липидных гидроперекисей;  $\tau$  – латентный период ХЛ, характеризующий резистентность ЛП к окислению, которая зависит от эндогенной антиоксидантной активности ЛП. Измерения проводили на хемилуминометре LKB1251, Швеция.

**Окислительный стресс *in vivo*** индуцировали с помощью острой гипобарической гипоксии (ОГГ). ОГГ создавали в барокамере проточного типа для предотвращения развития эффекта гиперкапнии [8].

При моделировании гипоксии животных по одному помещали в барокамеру и в течение 1 мин понижали давление до 0,195 атм для мышей и до 0,165 атм для крыс. При таком давлении животных выдерживали до момента остановки дыхания, после чего за 30 сек поднимали давление до атмосферного и извлекали животных из барокамеры.

Устойчивость животных к гипоксии оценивали по стандартным физиологическим характеристикам: времени до потери позы (ВПП, сек), времени до остановки дыхания (время жизни на высоте – ВЖ, сек), времени от момента перемещения животного в условия нормального атмосферного давления до восстановления активной позы (время рееституции – ВР, сек).

Для оценки влияния гипоксии на когнитивные функции мозга использовали тестирование в водном лабиринте Морриса. При обучении в тесте Морриса [13] каждому животному в 1-й серии предоставляли 5 попыток по 60 сек для поиска затопленной платформы. На следующие сутки в повторном эксперименте по такой же схеме в 5-ти попытках тестировали способность к запоминанию места расположения платформы. В экспериментах на мышках регистрировали количество успешных попыток, у крыс – время, затраченное на поиск платформы в каждой попытке, как при обучении, так и при тестировании.

**Определение общей антиоксидантной активности (ОАО)** в ткани мозга. После завершения физиологических исследований животных декапитуировали, образцы ткани мозга замораживали в жидком азоте и далее хранили до исследования при –80° С. Определение ОАО проводили спектрофотометрически – по восстановлению стабильного радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ-тест), измеряя снижение поглощения при длине волны 519 нм [14].

**Статистическая обработка результатов.** Данные обрабатывали в программе WinMDI 2.8 (Scripps Institute, La Jolla, USA), Microsoft Excel (США) и Statistica 6.0. Для оценки достоверности полученных различий применяли тесты Стьюдента и Манна-Уитни. Отклонения между рядами считали достоверными при вероятности различий, превышающих 95% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты исследования

*Влияние карнозина в составе нанолипосом и S-тролокс-карнозина на физиологические характеристики и общую антиоксидантную активность мозга экспериментальных*

животных в условиях ОГГ. Протекторное действие новых соединений карнозина в условиях развития окислительного стресса на уровне целого организма было изучено на модели ОГГ у грызунов.

**Карнозин в составе нанOLIпосом (КСЛ).** Введение мышам линии SAMR1 КСЛ в дозе 48 мг/кг массы тела за 1 ч до гипоксического воздействия достоверно повышало время до потери позы (47,8±13,7 сек, контроль – 34,9±6,7 сек) и время жизни на высоте (93,6±18,0 сек, контроль – 70,8±15,8 сек), при этом уменьшалось время реституции (49,0±11,2 сек, контроль – 68,4±15,2 сек) относительно группы контрольных животных, получавших физиологический раствор. Эти результаты были сопоставимы с действием L-карнозина в дозе 100 мг/кг массы тела в условиях воздействия ОГГ на крыс.

Использованный для оценки когнитивных функций мозга тест Морриса показал, что воздействие ОГГ снижает как эффективность процесса обучения (диаграмма для 1 дня тестирования), так и способность к запоминанию (диаграмма для 2 дня тестирования). Введение животным КСЛ увеличивало количество успешных попыток нахождения платформы мышами в процессе обучения и в ходе тестирования приобретенного навыка.

Введение КСЛ в условиях ОГГ обеспечивало достоверное повышение общей АОА, регистрируемой с помощью ДФПГ-теста в ткани мозга мышей, на 40% по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор.

Таким образом, введение КСЛ приводит к повышению устойчивости мышей SAMR1 к ОГГ, что сопровождается улучшением физиологических показателей на фоне повышения общей АОА мозга.

**S-тролокс-карнозин (S-ТК).** Для изучения антигипоксического действия S-ТК на основании ранее полученных данных [15] были выбраны дозы исследуемых соединений, характеризующиеся сопоставимой антиоксидантной эффективностью: карнозин – 100 мг/кг массы тела, тролокс – 10 мг/кг и S-ТК – 50 мг/кг. Результаты сравнения антигипоксического действия карнозина, тролокса и S-ТК представлены в табл. 1. Было показано, что все исследуемые соединения при введении за 1 ч до ОГГ в 2–2,5 раза увеличивали время до потери позы и время жизни на высоте в условиях гипоксии. При этом в группах, получавших исследуемые соединения, гибель животных не наблюдалась, тогда как в контрольной группе, получавшей физиологический раствор, 2 животных погибли. Таким образом,

таблица 1: Влияние карнозина, тролокса и их производного S-ТК на устойчивость крыс Wistar к острой гипобарической гипоксии.

Определяемые параметры	ОГГ+физ. раствор	ОГГ+ карнозин	ОГГ+ тролокс	ОГГ+S-ТК
Время до потери позы, с	37±4	67±7*	82±8*	56±3*
Время жизни на высоте ОГГ, с	73±6	133±18*	148±15*	151±34*

Примечание: \* – p<0,05 по отношению к группе ОГГ+физ. раствор.

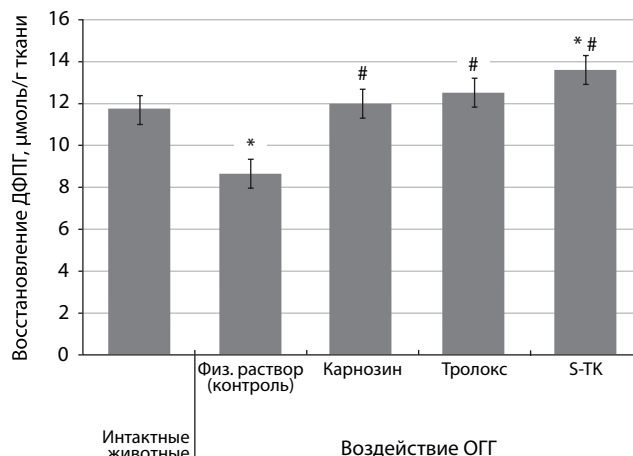


рис. 1: Влияние S-тролокс-карнозина, карнозина и тролоксана на общую антиоксидантную активность, определяемую по восстановлению ДФПГ-радикала в ткани мозга крыс, перенесших острую гипобарическую гипоксию (мкмоль/г ткани мозга, восстановленного ДФПГ).

\* – p<0,05 по отношению к интактным крысам; # – p<0,05 по отношению к крысам, получавшим физиологический раствор.

эффективность S-ТК в данных экспериментальных условиях была сопоставима с действием вдвое большей дозы карнозина.

Исследование когнитивных функций мозга у крыс с помощью теста Морриса показало, что введение исследуемых соединений в одинаковой степени сокращает время поиска платформы как в процессе обучения (карнозин – 25,7±6,6 с, тролокс – 17,5±8,6 с, S-ТК – 25,1±6,6 с, контроль – 41,2±7,1 с), так и при последующем тестировании сохранности полученных навыков (карнозин – 7,8±1,3 с, тролокс – 9,5±1,9 с, S-ТК – 9,5±2,3 с, контроль – 18,8±2,6 с). Полученные данные указывают на то, что животные, получавшие карнозин, тролокс и S-ТК, проявляют одинаковую физиологическую устойчивость в условиях ОГГ, при этом доза вводимого карнозина была вдвое выше дозы S-ТК.

В ДФПГ-тесте было показано (рис. 1), что введение крысам исследуемых соединений обеспечивало повышение общей антиоксидантной активности ткани мозга животных относительно группы контроля, а в случае с S-ТК – и относительно интактных животных.

*Механизмы защитного действия карнозина в составе нанOLIпосом и S-тролокс-карнозина в условиях индукции окислительного стресса in vitro.* Механизмы защитного действия новых соединений карнозина были изучены на различных клеточных моделях в условиях индукции окислительного стресса.

**Карнозин в составе нанOLIпосом (КСЛ).** Для оценки антиоксидантной активности КСЛ в суспензии гранулярных клеток мозжечка мышей SAMR1 индуцировали ОС пероксидом водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Уровень АФК при инкубации нейронов с 3,5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 30 мин увеличивался примерно в 3 раза (до 297,65%) относительно контроля, принятого за 100%. Внесение в инкубационную среду за 30 мин до индукции ОС КСЛ (до конечной концентрации карнозина 2,65 мМ) подавляло рост АФК, уровень которых (95,2%) был сопоставим с контролем. При этом также снижалась и смертность нейронов: в популяции клеток, ин-

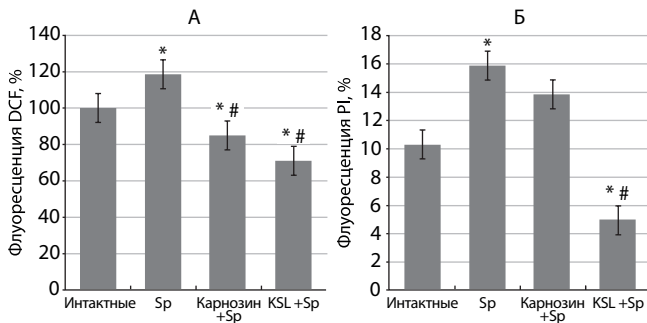


рис. 2: Влияние карнозина в составе липосом и карнозина на уровень АФК (А) и гибель клеток (Б) в культуре РС-12, дифференцированной по нейрональному типу при 1 ч инкубации в присутствии 500 мкМ спермина.

\* –  $p < 0,05$  по отношению к интактным клеткам; # –  $p < 0,05$  по отношению к клеткам, инкубированным со спермином.

кубированных с  $H_2O_2$ , эта величина составляла  $21,2 \pm 3,0\%$ , а в присутствии КСЛ она не превышала  $15,4 \pm 2,9\%$ . Таким образом, КСЛ эффективно снижал накопление АФК в суспензии нейрональных клеток и предотвращал их гибель.

В следующей серии экспериментов мы оценивали защитное действие КСЛ на модели окислительного стресса, индуцированного биогенным амином спермином и продуктом его обмена акролеином. Инкубация клеток РС-12, дифференцированных по нейрональному типу, в присутствии 500 мкМ спермина в течение 1 ч приводила к росту АФК на 19% относительно интактных клеток (рис. 2А); при этом доля мертвых клеток в культуре увеличивалась на 60% (рис. 2Б). Внесение в инкубационную среду 1 мМ карнозина одновременно со спермином приводило к снижению уровня АФК на 27% и гибели клеток на 40% относительно интактных клеток. Однако наиболее выраженный нейропротекторный эффект наблюдался при внесении КСЛ (содержащих эквимолярную концентрацию карнозина), который предотвращал рост АФК и гибель клеток в культуре до значений, сопоставимых с интактными клетками.

КСЛ и карнозин эффективно повышали жизнеспособность клеток первичной культуры нейронов в присутствии спермина и акролеина. Выживаемость клеток под действием спермина снижалась до 83% (рис. 3Б). При этом 1 мМ карнозин повышал выживаемость клеток до 100%, а КСЛ в эквимолярной по карнозину концентрации – до 108% относительно интактных клеток. В условиях ОС, индуцированного 1 мМ акролеина (рис. 3А), высокотоксичного продукта окисления полиаминов, КСЛ наиболее эффективно повышал жизнеспособность клеток в культуре: выживаемость клеток под действием акролеина составила 7%, в присутствии карнозина – 30%, КСЛ – 75%.

Таким образом, карнозин в составе нанолипосом с высокой эффективностью предотвращал развитие ОС, препятствуя росту АФК и снижая гибель клеток в культуре РС-12, и повышал жизнеспособность клеток первичной культуры нейронов.

**S-тролокс-карнозин (S-ТК).** Оценка антиоксидантной активности S-ТК в ХЛ-тесте выявила его более высокую эффективность относительно карнозина и тролокса. Так, внесение в суспензию липопротеинов 1 мМ карнозина препятствовало росту липидных гидроперекисей на 57%, 1 мМ тролокса – на 58% и 1 мМ S-ТК – на 75%. При этом карно-

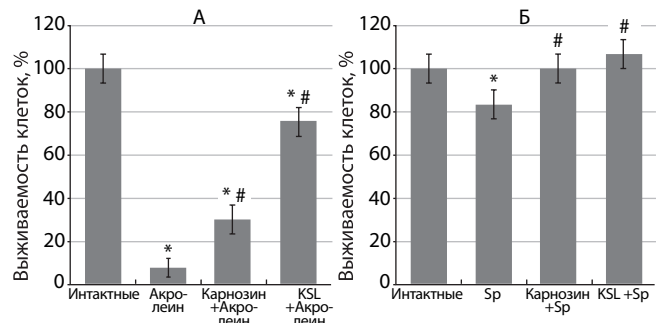


рис. 3: Влияние карнозина в составе липосом и карнозина на жизнеспособность клеток первичной культуры нейронов мозжечка крыс в условиях токсичности 500 мкМ спермина (А) и 1 мМ акролеина (Б) при 24 ч инкубации.

\* –  $p < 0,05$  по отношению к интактным клеткам; # –  $p < 0,05$  по отношению к клеткам, инкубированным со спермином или акролеином.

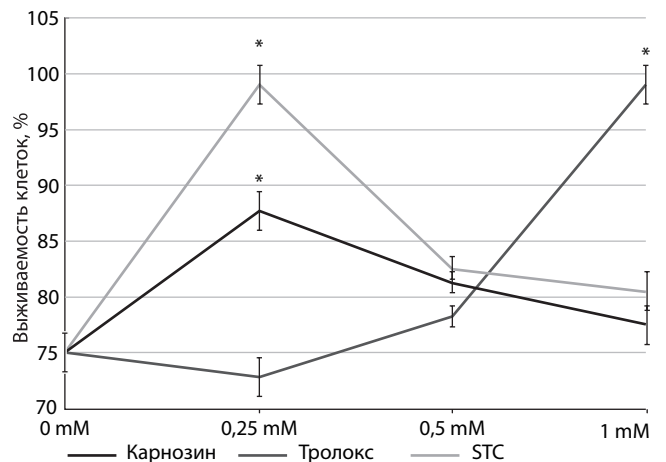


рис. 4: Влияние S-тролокс-карнозина, карнозина и тролокса (от 0,25 до 1 мМ) на жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях токсичности  $5 \cdot 10^{-5}$  М кадмия при 24 ч инкубации.

\* –  $p < 0,05$  по отношению к клеткам, инкубированным с кадмием.

зин повышал резистентность липопротеинов к окислению на 62%, тролокс – на 100% и S-ТК – на 165%, что свидетельствует о его высокой антиоксидантной активности.

ОС в экспериментах на культуре нейробластомы человека SH-SY5Y индуцировали кадмием – одним из наиболее цитотоксичных тяжелых металлов (рис. 4). Внесение  $5 \cdot 10^{-5}$  М кадмия в культуру приводило к 30% гибели клеток, измеренной по МТТ-тесту. Добавление 0,25 мМ S-ТК в инкубационную среду, содержащую кадмий, приводило к снижению уровня АФК на 20% и обеспечивало 100% выживаемость клеток в этих условиях, в то время как выживаемость под действием 0,25 мМ карнозина составила 88%, 0,25 мМ тролокса – 73%. Тролокс, в противоположность карнозину и S-ТК, обеспечивал 100% выживаемость клеток только в высокой концентрации (1 мМ). Полученные данные об эффективном влиянии S-ТК на жизнеспособность клеток коррелировали со снижением доли некротических клеток под действием 0,25 мМ S-ТК на 32%, 0,25 мМ карнозина – на 22% и отсутствием влияния на этот параметр у 0,25 мМ тролокса. Таким образом, в условиях индукции ОС кадмием S-ТК характеризовался наиболее выраженным цитопротекторным действием.



## Обсуждение

В условиях ОГГ у грызунов получены новые данные, указывающие на способность карнозина как в комплексе с тролоксом (S-ТК), так и в составе нанолипосом (КСЛ), защищать мозг от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Профилактическое введение исследуемых соединений животным приводило к улучшению физиологических показателей и повышению антиоксидантной активности ткани мозга. Эти эффекты сопровождались большей сохранностью приобретенных навыков в водном лабиринте Морриса относительно карнозина, что свидетельствует о влиянии новых соединений карнозина не только на обучение, но и способность к запоминанию.

В то же время эффективность КСЛ (48 мг/кг) и S-ТК (50 мг/кг) была сопоставима с действием L-карнозина, вводимого в дозе 100 мг/кг. Полученные данные позволяют сделать заключение о более высоком (в 2 раза) протекторном действии КСЛ и S-ТК по сравнению с карнозином.

На экспериментальных моделях *in vitro* были изучены механизмы защитного действия КСЛ и S-ТК на различных клеточных моделях в условиях индукции ОС. Тестирование КСЛ при индукции ОС пероксидом водорода выявило его способность подавлять рост АФК и снижать гибель в суспензии гранулярных клеток мозжечка.

В следующей серии экспериментов, проведенной на культуре клеток PC-12, дифференцированных по нейрональному типу, была показана более высокая нейропротекторная эффективность КСЛ относительно карнозина в условиях ОС, индуцированного биогенным аминокислотным спермином. Сопоставимые результаты были получены при оценке влияния КСЛ на жизнеспособность первич-

ной культуры нейронов мозжечка крысы, измеренную по МТТ-тесту, при индукции ОС продуктом метаболизма спермина акролеином.

При изучении антиоксидантного действия S-ТК была выявлена более выраженная способность этого соединения защищать липопротеины сыворотки крови от Fe<sup>2+</sup>-индуцированного окисления, чем у тролокса и карнозина. Можно полагать, что более высокая антиоксидантная активность S-ТК по сравнению с тролоксом и карнозином обусловлена его способностью более эффективно предотвращать рост АФК при индукции ОС N-метил-D-аспаратом (NMDA) или пероксидом водорода в суспензии гранулярных клеток мозжечка [15].

Протекторное действие S-ТК, исследованное на культуре нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях ОС, индуцированного кадмием, проявлялось в повышении жизнеспособности клеток, обусловленном снижением роста АФК и доли некротических клеток. Известно, что в основе токсического действия кадмия (а также свинца никеля, ртути и мышьяка) лежит истощение тиол-содержащих антиоксидантов (глутатион, липоевая кислота, цистеин и N-ацетилцистеин) и антиоксидантных ферментов [19]. Эти процессы сопровождаются ростом уровня АФК в клетках и тканях и развитием ОС, в связи с чем применение антиоксидантов позволяет предотвратить токсичность тяжелых металлов [17].

Проведенные исследования позволяют рассматривать карнозин в составе нанолипосом и S-тролокс-карнозин как соединения с высоким антигипоксическим и антиоксидантным действием и открывают перспективы для разработки и применения их в неврологии.

*Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00829.*

## Список литературы

1. *Болдырев А.А.* Карнозин: новые концепции для функции давно известной молекулы. *Биохимия* 2012; 77 (40): 403–418.
2. *Федорова Т.Н.* Окислительный стресс и защита головного мозга от ишемического повреждения. Автореф. дисс. ...д. б. н. М., 2004; 40.
3. *Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmägi M. et al.* Functional Interaction Between Na/K-ATPase and NMDA Receptor in Cerebellar Neurons. *Mol. Neurobiol.* 2014; epub ahead.
4. *Bellia F., Vecchio G., Cuzzocrea S. et al.* Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Mol. Aspects Med.* 2011; 32: 258–266.
5. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 2013; 93: 1803–1845.
6. *Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M. et al.* Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuv. Res.* 2008; 11: 988–994.
7. *Boldyrev A., Song R., Dyatlov V.A. et al.* Neuronal cell death and reactive oxygen species. *Cell Mol. Neurobiol.* 2000; 20 (4): 433–450.
8. *Boldyrev A.A., Stvolinsky S.L., Tyulina O.V. et al.* Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1997; 17: 259–271.
9. *Hipkiss A.R.* Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv. Food Nutr. Res.* 2009; 57: 87–154.
10. *Johnson P., Hammer J.L.* Histidine dipeptide levels in ageing and hypertensive rat skeletal and cardiac muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1992; 103 (4): 981–984.
11. *Lenney J.F.* Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). *Biol. Chem. Hoppe Seyler J.* 1990; 371: 433–440.
12. *Meguro K., Boldyrev A., Sato T. et al.* Novel Carnosine Derivative and Composition Containing the Same. JP2008-19188, Japan.
13. *Morris R.* Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1984; 11: 47–60.
14. *Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch, R.* Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Rad. Res.* 2002; 36: 177–187.
15. *Stvolinsky S.L., Bulygina E.R., Fedorova T.N. et al.* Biological Activity of Novel Synthetic Derivatives of Carnosine. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010; 3: 395–404.
16. *Stvolinsky S., Antipin M., Meguro K. et al.* Effect of carnosine and its Trolox-modified derivatives on life span of *Drosophila melanogaster*. *Rejuv. Res.* 2010; 13: 453–457.
17. *Stohs S.J., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M.* Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2001; 20 (2): 77–88.
18. *Sureda F.X., Camins A., Trullas R. et al.* A flow cytometric study of N-methyl-D-aspartate effects on dissociated cerebellar cells. *Brain Res.* 1996; 723: 110–114.
19. *Valko M., Morris H., Cronin M.T.* Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12 (10): 1161–1208.

20. Zhong Y., Bellamkonda R.V. Biomaterials for the central nervous system. J. R. Soc. Interface 2008; 5: 957–975.

21. Zolnik B.S., Sadrieh N. Regulatory perspective on the importance of

ADME assessment of nanoscale material containing drugs. Adv. Drug Deliv. Rev. 2009; 61: 422–427.

22. www.nap.edu/books/0309083893/html/R1.html.1996.

## The neuroprotective efficacy of carnosine-containing nanoliposomes and S-trolox-carnosine under oxidative stress conditions *in vitro* and *in vivo*

T.N. Fedorova, S.L. Stvolinskiy, O.I. Kulikova, E.V. Konovalova, I.S. Levacheva, O. Samsonova, U. Bakovskiy

*Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

**Keywords:** S-trolox-carnosine, carnosine-containing nanoliposomes, acute hypobaric hypoxia, oxidative stress, neuronal cell cultures, antioxidant protection.

We investigated the protective effect of carnosine (carnosine-containing nanoliposomes and newly synthesized S-trolox-carnosine) in experiments *in vivo* on a model of acute hypobaric hypoxia in rodents and *in vitro* on neuronal cultures under oxidative stress conditions. We demonstrated the ability of new carnosine compounds to increase resistance of animals to acute hypobaric hypoxia, protecting the brain from oxidative damage. This effect is accompanied by preservation of acquired skills in the Morris water maze test, which is likely related to an increased efficiency of the brain antioxidant system.

When oxidative stress was induced by hydrogen peroxide, spermine, acrolein, or cadmium in a suspension of cerebellar granule cells of the SAMP1 mouse line, a primary culture of rat cerebellar neurons, and a culture of neuronally differentiated PC-12 cells, carnosine (carnosine-containing nanoliposomes and S-trolox-carnosine) was able to inhibit generation of reactive oxygen species and reduce death of cells, enhancing the cell viability. The study results demonstrate high antihypoxic and antioxidant activities of the new carnosine compounds and open up prospects for the development and use of carnosine-based drugs in neurology.

**Контактный адрес:** Федорова Татьяна Николаевна – докт. биол. наук, зав. лабораторией клинич. и эксперим. нейрохимии ФГБНУ НЦН. 125367 Москва, Волоколамское ш., д. 80; тел.: +7 (495) 490-24-09; e-mail: tnf51@bk.ru;

Стволинский С.Л. – вед. науч. сотр. лаборатории клинич. и эксперим. нейрохимии ФГБНУ НЦН;

Куликова О.И. – мл. науч. сотр. лаборатории клинич. и эксперим. нейрохимии ФГБНУ НЦН;

Коновалова Е.В. – науч. сотр. лаборатории клинической и эксперим. нейрохимии ФГБНУ НЦН;

Левачева И.С. – науч. сотр. Филиппс Университета, Институт Фармацевтической технологии (Марбург, Германия);

Самсонова О. – науч. сотр. Филиппс Университета, Институт Фармацевтической технологии (Марбург, Германия);

Бакровский У. – директор Филиппс Университета, Институт Фармацевтической технологии (Марбург, Германия).