

©Коллектив авторов

ЛИПОИЛКАРНОЗИН: СИНТЕЗ, ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

С.Л. Стволинский^{1*}, Н.А. Антонова², О.И. Куликова^{1,3}, А.В. Лопачев¹, Д.А. Абаимов¹, И. Аль-Байдани², О.М. Лопачева^{1,4}, Т.Н. Фёдорова¹, А.П. Каплун², Г.М. Сорокоумова²

¹Научный центр неврологии,
125367, Москва, Волоколамское шоссе, д.80; эл. почта: slstvolinsky@mail.ru

²Российский технологический университет, Москва

³Российский университет дружбы народов, Москва

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Международный биотехнологический центр, Москва

Описано получение липоилкарнозина (ЛипК) – конъюгированной молекулы на основе двух природных антиоксидантов карнозина и α -липовой кислоты и охарактеризованы его физико-химические, антиоксидантные свойства и биологическая активность. По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ детектора чистота полученного конечного продукта составила 89,3%. Методом тандемной ВЭЖХ-масс-спектрометрии была подтверждена индивидуальность полученной натриевой соли ЛипК. ЛипК проявлял высокую устойчивость к гидролизу сывороточной карнозиной и характеризовался большей, чем у карнозина и липовой кислоты антиоксидантной активностью по реакции с образованием продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, и по кинетическим параметрам железо-индуцированной хемилюминесценции. ЛипК в концентрациях, не превышающих 5 мМ, не влиял на жизнеспособность интактных клеток культуры нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, а в диапазоне концентраций 0,1-0,25 мМ обеспечивал цитопротекторное действие в условиях моделирования на культуре клеток 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺)-индуцированной токсичности.

Ключевые слова: карнозин; α -липовая кислота; липоилкарнозин; антиоксидант; карнозиная; паркинсонизм

DOI: 10.18097/PBMC20186403268

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной задачей остаётся поиск и разработка препаратов нейропротекторного действия, на решение которой направлено большое число биомедицинских исследований [1, 2], что обусловлено высокой социальной значимостью и широким распространением нейродегенеративных и сосудистых заболеваний головного мозга. Основным молекулярным механизмом, лежащим в основе гибели нервной ткани, является окислительный стресс (ОС) [3-5]. Протекторами клеток и тканей от ОС являются антиоксиданты [6]. Одним из перспективных антиоксидантов является природный нейропептид карнозин. Он обладает не только свойствами прямого антиоксиданта – перехватчика радикалов, но и является антигликирующим агентом, хелатором ионов металлов, молекулярным шапероном и индуктором антиоксидантных систем в условиях ОС [7]. Антиоксидантное и нейропротекторное действие карнозина было показано на разнообразных моделях в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [7, 8]. В пилотных исследованиях было показано, что карнозин повышает эффективность базисной терапии у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией [9] и болезнью Паркинсона [10]. Однако действие карнозина в организме ограничено его гидролизом, катализируемым специфическим ферментом – карнозиной, и низкой липофильностью [11].

Эти особенности карнозина обуславливают необходимость его модификации с целью повышения стабильности и улучшения биодоступности [12].

Другим перспективным антиоксидантом является α -липовая кислота (ЛК). ЛК представляет собой небольшую молекулу, содержащую две окисленные или восстановленные (в случае дигидролиповой кислоты – ДГЛК) тиоловые группы. ДГЛК – предпочтительная форма соединения, присутствующая в тканях организма, однако и ДГЛК и ЛК способны перехватывать активные формы кислорода (АФК) и восстанавливать эндогенные антиоксиданты – глутатион, витамины Е и С. Благодаря такому сочетанию свойств их рассматривают как перспективный терапевтический препарат [13]. Несмотря на то, что в ряде исследований была показана эффективность ЛК при диабете, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, аутоиммунных заболеваниях, её дальнейшее применение нуждается в дополнительных исследованиях [14, 15].

Следует отметить, что производителями пищевых добавок были предложены композиции, включающие смесь карнозина и ЛК, предназначенные для повышения чувствительности к инсулину и замедления процессов старения [16, 17]. Описан также фармакологический препарат на основе смеси ЛК и карнозина, устраняющий синдром фантомных болей [18].

Недавно из карнозина и ЛК было синтезировано новое вещество, названное авторами ADM_09 [19] (натриевая соль липоилкарнозина, далее ЛипК). Было показано, что оно способно нейтрализовать супероксид-радикал *in vitro* в системе ксантин – ксантин оксидаза и в модели оксалиплатин-индуцированного окислительного стресса, а также снижать нейропатические боли в экспериментах *in vivo* [19, 20]. В то же время является актуальной проблема оценки эффективности и механизмов антиоксидантного действия данного соединения. Представляется перспективным изучение нейропротекторного действия ЛипК в условиях моделирования различных патологических процессов ЦНС.

Целью данной работы было получение ЛипК, изучение его физико-химических характеристик, устойчивости к гидролизу карнозиназой, антиоксидантных свойств, оценка его влияния на жизнеспособность культуры нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу в условиях 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺)-индуцированной токсичности.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали следующие вещества: карнозин (“Yonezawa Hamari Chemicals, Ltd”, Япония), 1% раствор пенициллин-стрептомицин, раствор Хенкса, среда MEM с солями Эрла с глутамином, среда MEM/F-12 без глутамин (“ПанЭко”, Россия), 10% эмбриональная телячья сыворотка (“РАА Laboratories”, США), α-липоевая кислота, ретиноевая кислота, 2-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат, 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺) (“Sigma”, США), соевый фосфатидилхолин (ФХ) (SPC-100, “Lipoid”, Германия); циклогексилкарбодиимид (ДЦК), N-гидроксисукцинимид, гидрокарбонат натрия, серная кислота, перманганат калия, уксусная кислота,

хлороформ, этиловый спирт, хлорид натрия, диметилсульфоксид (ДМСО), этилацетат, гексан, тетрагидрофуран (ТГФ), диметилформамид (ДМФА), ацетон, вышеперечисленные реактивы были х.ч. (“Химмед”, Россия).

Для колоночной хроматографии использовали Silica Gel MN Kieselgel 60 (0,04-0,063 мм; “Merck”, Германия).

В экспериментах использовали клеточную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y (“ATCC”, США).

Оборудование

Для культивирования культуры клеток нейробластомы человека использовали 96 луночные планшеты (“Nunc”, Дания) и клеточный инкубатор (“ShellLab”, США). Для измерения оптической плотности в МТТ-тесте использовали многофункциональный планшетный ридер Synergy H4 Hybrid Multi-Mode (“Biotek”, США).

Для масс-спектрометрического анализа (метод ESI-МС) использовали хроматомасс-спектрометр LCQ Fleet (“Thermo Fisher Scientific”, (США)), оборудованный градиентным насосом постоянного давления (“Finnigan Surveyor LC Pump Plus”), и масс-спектрометрическим детектором типа квадрупольная ионная ловушка (LCQ Fleet MS). Для прямого ввода образца ЛипК в масс-детектор применяли хроматографический дозирующий шприц Hamilton, объемом в 500 мкл, который при помощи регулируемого насоса создавал поток жидкости 10 мкл/мин.

¹H-ЯМР спектры фиксировали на спектрометре BrukerBioSpin 300 GmbH (Германия) с частотой 300 Гц (число сканов: 11, число точек: 128000).

Получение ЛипК

ЛипК получали согласно методике, описанной в работах Nativi и соавт. [19, 20]. Схема синтеза представлена на рисунке 1.

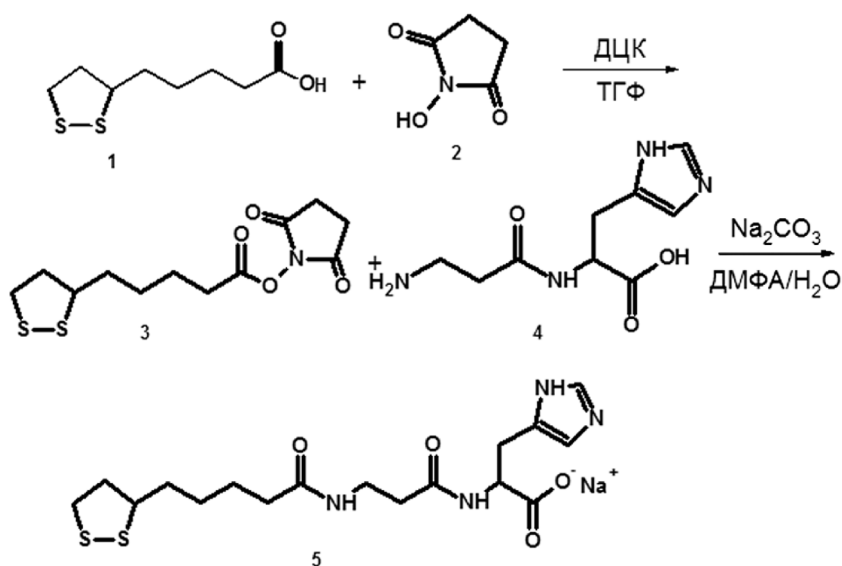


Рисунок 1. Схема синтеза ЛипК, где 1 - ЛК, 2 - N-гидроксисукцинимид, 3 - N-оксисукцинимидный эфир липоевой кислоты, 4 - карнозин, 5 - ЛипК; ДЦК - дициклогексилкарбодиимид, ТГФ - тетрагидрофуран, ДМФА - диметилформамид.

Синтезированный ЛипК очищали с помощью адсорбционной колоночной хроматографии на силикагеле.

Адсорбционная колоночная хроматография

Порошок неподвижной фазы (40 г силикагеля) суспендировали в смеси изопропанола с раствором аммиака (25%, 3:1), используемой в качестве подвижной фазы, и перемещали в колонку диаметром 3 см. 400 мг ЛипК растворяли в 5 мл той же смеси и наносили на колонку. В процессе хроматографирования собирали элюент по 1 мл, и полученные фракции анализировали на наличие ЛипК с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Тонкослойная хроматография

ТСХ проводили с использованием пластин с силикагелем (TLC Silicagel 60 F254 “Merck”), 20×20 см, толщиной 0,2 мм, на алюминиевой подложке с использованием системы растворителей: изопропанол – водный раствор аммиака (25%, 3:1). Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали 0,1 М раствор KMnO_4 в 0,1 М CH_3COOH .

Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР)

Регистрацию спектров проводили на приборе ЯМР с частотой 300 Гц. Протонный ЯМР спектр был выполнен со следующими параметрами: число сканов: 11, число точек: 128000.

Тандемная ВЭЖХ-масс-спектрометрия

Индивидуальность полученной ЛипК подтверждали методом тандемной ВЭЖХ-масс-спектрометрии; аналитическая фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде с добавкой 5% ацетонитрила; подвижная фаза Б: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле с добавкой 5% деионизованной воды. Режим хроматографического элюирования – градиент: 1% Б (0-2 мин), от 1% до 50% Б (2-12 мин), 50% Б (12-17 мин), 1% Б (17-20 мин); поток: 0,5 мл/мин [21].

Определение устойчивости ЛипК к гидролизу сывороточной карнозиназой

Для определения устойчивости к сывороточной карноминазе ЛипК и свободного карнозина был использован метод, предложенный Пеговой и соавт. [22]. В исследовании использовали смесь образцов сыворотки, полученных от нескольких доноров. Сывороточную карноминазу активировали путём инкубации с 5 мМ CdCl_2 при 37°C в течение 30 мин. Затем к инкубационной смеси добавляли раствор карнозина или ЛипК в конечной концентрации 2 мМ. Пробы инкубировали в течение 0 – 15 – 30 – 45 – 60 – 90 – 120 – 150 – 180 мин и смешивали их с охлажденной 20% ТХУ, денатурированные белки осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 30 мин при 5°C, супернатант использовали для анализа. В качестве контроля были взяты пробы, которые инкубировали без добавления сыворотки. Определение содержания ЛипК и карнозина в пробах проводили методом тандемной ВЭЖХ-масс-спектрометрии, как описано выше. Отклик прибора в условных единицах интегрирования от стартовых образцов (0 мин), содержащих карнозин и ЛипК в концентрации 2 мМ, принимали за 100%,

остальные образцы нормировали на площадь пика стартового образца. Данные обрабатывали с помощью программы Xcalibur 2.1 Foundation 1.0.1.

Культура нейробластомы человека SH-SY5Y

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y культивировали на смеси сред Игла MEM с солями Эрла с глутамином и F-12 без глутамин в соотношении 1:1, с добавлением 1% раствора пенициллина-стрептомицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Культуру содержали в клеточном инкубаторе при 37°C, 90% влажности, 5% CO_2 . Каждые 3-е суток производили замену среды [23]. Дифференцировку клеток по дофаминергическому типу вызывали снижением в среде сыворотки до 1% и последующим культивированием в течение 7 суток в присутствии ретиноевой кислоты в конечной концентрации 10 мкМ с добавлением через 3 суток 2-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата в конечной концентрации 75 нМ [24].

Оценка жизнеспособности клеток

Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Метод основан на восстановлении живыми клетками жёлтого 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромида (МТТ) в синий формазан [25].

Для оценки влияния ЛипК на жизнеспособность клеток исследуемое соединение добавляли в лунки до конечных концентраций 0,1 – 0,25 – 0,50 – 0,75 – 1,0 – 5,0 мМ и инкубировали планшеты в течение 24 ч. Затем среду заменяли раствором МТТ в концентрации 0,5 мг/мл, приготовленным на среде культивирования. Через 3 ч полностью удаляли среду с МТТ, не затрагивая образовавшиеся кристаллы формазана. Кристаллы растворяли, добавляя в каждую лунку по 100 мкл ДМСО, и измеряли оптическую плотность при длинах волн 570 нм и 660 нм на планшетном ридере Synergy H4 (“BioTek Instruments, Inc.”, США). Из величины оптической плотности при 570 нм вычитали показания при 660 нм и отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали лунки, в которых отсутствовали клетки. Данные представлены в процентах от уровня сигнала в лунках с интактными клетками. Обработку результатов проводили в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism 6.

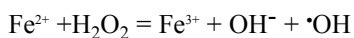
Для определения цитопротекторного действия ЛипК в лунки с клетками вносили раствор нейротоксина МФП+ в конечной концентрации 2 мМ, затем добавляли ЛипК в диапазоне концентраций 0,1 – 0,25 – 0,50 мМ и инкубировали в течение 24 ч. К контрольным клеткам ЛипК и МФП+ не добавляли. Далее проводили МТТ-тест по описанной выше процедуре.

Определение антиоксидантной активности ЛипК, карнозина и ЛК

Образование продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП)

Антиоксидантную активность карнозина, ЛК и ЛипК в концентрации 5 мМ оценивали по способности

предотвращать рост ТБК-РП в условиях индукции образования АФК, используя в качестве субстрата окисления соевый фосфатидилхолин (ФХ) [26]. Для индукции образования АФК при моделировании перекисного окисления липидов использовали реакцию Фентона:



Конечная концентрация исследуемых антиоксидантов – карнозина, липоевой кислоты и липоилкарнозина в пробах при этом составляла 50 мкМ, 250 мкМ и 1000 мкМ.

Метод железо-индуцированной хемилюминесценции

Оценку антиоксидантной активности исследуемых соединений проводили на модели Fe^{2+} -индуцированного окисления суммарной фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛП), выделенных из сыворотки здоровых лиц. В качестве контроля использовали пробы, содержащие суспензию ЛП без добавления исследуемых соединений.

Метод основан на измерении параметров хемилюминесценции (ХЛ) в условиях окисления суспензии ЛП ионами двухвалентного железа. Регистрировали следующие кинетические параметры ХЛ: быструю вспышку ХЛ (h, мВ), отражающую стационарный уровень липидных гидроперекисей; длительность латентного периода возгорания ХЛ (лаг-период, τ , с), характеризующего резистентность ЛП к окислению, которая зависит от их эндогенной антиоксидантной активности. Измерения проводили на хемилюминиметре Luminometer LKB1251 (Швеция) [27].

Определение стабильности ЛипК

Оценку стабильности ЛипК проводили с использованием метода ВЭЖХ-хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) по следующей схеме: водный раствор вещества в концентрации 10 мкг/мл хранили при 4°C, в течение первой недели хранения исследования проводили ежедневно, затем трижды на 14-й, 21-й, и 28-й дни. Для оценки стабильности использовали метод целевого масс-спектрометрического анализа ЛипК. Для этого определяли площадь хроматографического пика по полному ионному току дочерних ионов, образующихся при фрагментации родительского иона ЛипК с m/z 415,3 (рис. 2).

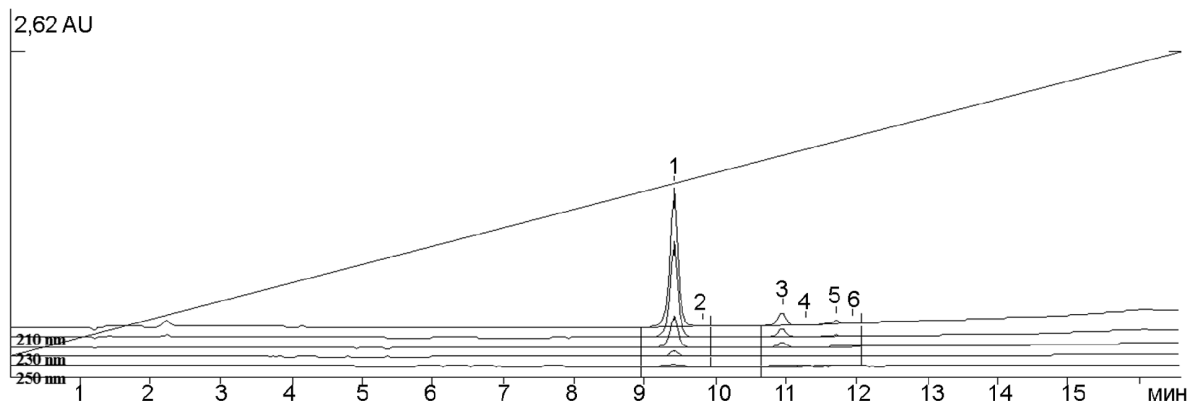


Рисунок 3. Определение чистоты полученного ЛипК методом ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические характеристики ЛипК

По результатам адсорбционной колоночной хроматографии в системе изопропанол – аммиак (3:1) и ТСХ-анализа фракций было показано, что синтезированное соединение выходит во фракциях 40-82. В образцах, полученных из каждой фракции, исследовали распределение ЛипК, ЛК и карнозина с помощью ТСХ. По данным ТСХ, в используемой системе растворителей фактор удерживания R_f на пластине для ЛипК равен 0,52, для ЛК – 0,61, для карнозина – 0,17.

Для дальнейших исследований фракции с 40 по 82 были объединены и порционно высушены на роторном испарителе. Согласно обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ детектора, чистота полученного конечного продукта (ЛипК) составила 89,3% (рис. 3, табл. 1).

Структуру полученного соединения подтверждали методом ^1H -ЯМР и масс-спектрометрии.

Ядерно-магнитный резонанс

В спектре ^1H -ЯМР (D_2O) были выявлены сигналы с химическими сдвигами (м.д.): ^1H -ЯМР (D_2O δ , м.д.): 7,98 (1H, с, $\text{NH}-\text{CH}=\text{N}$); 7,05 (1H, с, $\text{N}-\text{CH}=\text{C}$); 4,27 (1H, м, $\text{CH}-\text{S}$); 3,43 (2H, м, CH_2-NH); 3,06-2,91 (2H, м, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}$); 2,80 (4H, м, $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{S}$); 2,28 (2H, т, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ (карнозин)); 1,99 (2H, т, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ (ЛК)); 1,74; 1,43; 1,18 (6H, м, CH_2 (ЛК кроме $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$)). Полученные результаты соответствуют сигналам для вещества ADM_09 [19].

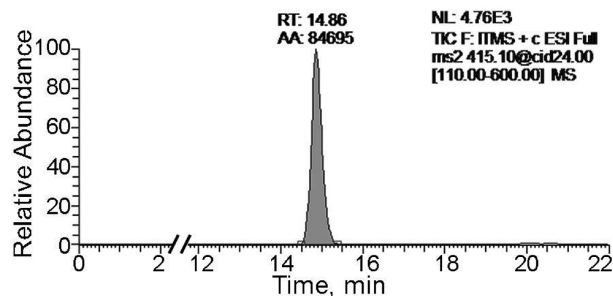


Рисунок 2. Масс-хроматограмма по полному ионному току дочерних ионов, образующихся при фрагментации родительского иона ЛипК с m/z 415,1 при нормализованной энергии соударений 34 эВ.

Таблица 1. Определение чистоты синтезированного липоилкарнозина (ЛипК) методом ВЭЖХ: результаты расчёта (метод расчёта - нормировка отклика при длине волны 210 нм по отношению к суммарной площади пиков)

№ пика	Время удерживания, мин	Площадь пика (AU*сек)	Площадь (%)
1	9,41	55,06	89,31
2	9,79	0,21	0,34
3	10,94	4,90	7,96
4	11,26	0,097	0,16
5	11,70	1,17	1,90
6	11,92	0,205	0,33
Общая продолжительность хроматографирования		Суммарная площадь пиков	Нормирование
	16,58	61,642	100%

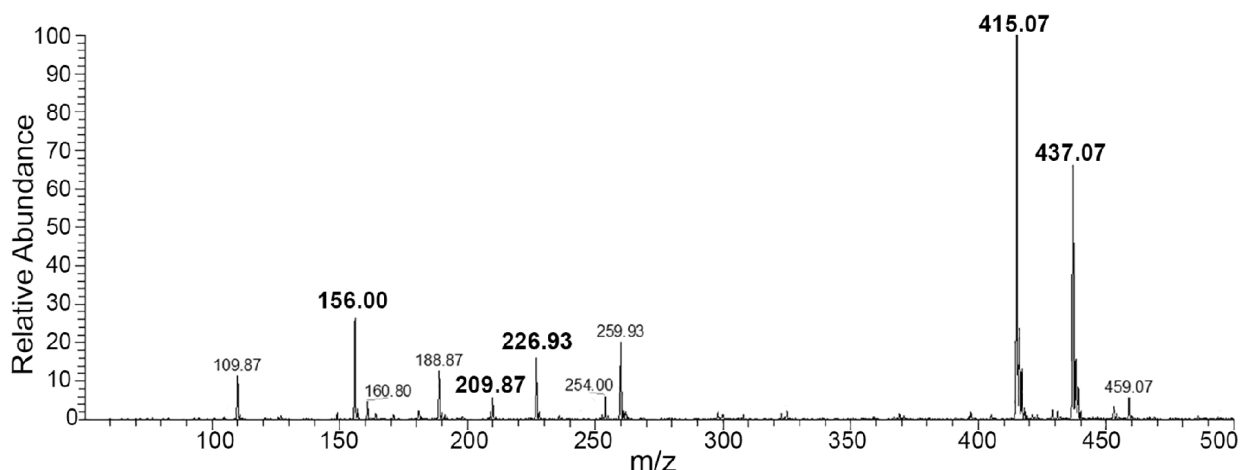


Рисунок 4. Масс-спектр липоилкарнозина (ЛипК) (получен прямым шприцевым вводом, способ ионизации - электрораспыление).

Масс-спектрометрический анализ

На рисунке 4 представлен масс-спектр полученного ЛипК. Молекулярная масса ЛипК равна 414 г/моль, чему соответствует молекулярный пик данного соединения с отношением массы к заряду m/z 415 = $[M+H]^+$ (протонированный ЛипК). Также на масс-спектре присутствуют пик натриевого аддукта ЛипК со значением m/z 437 = $[M+Na]^+$ и набор фрагментов ЛипК, среди которых можно отметить фрагменты с m/z 156, 209, 226, которые могут соответствовать гистидину, ДГЛК и карнозину.

Таким образом, по исследованным физико-химическим характеристикам полученное нами соединение карнозина с ЛК полностью соответствует веществу ADM_09 [19].

Исследование антиоксидантной активности ЛипК

Сравнительная оценка эффективности антиоксидантного действия ЛипК с ЛК и карнозином была проведена с помощью двух взаимодополняющих методов: по образованию ТБК-РП и информативным кинетическим параметрам железо-индуцированной хемилюминесценции в диапазоне следующих концентраций: 50 – 250 – 1000 мкМ.

Образование продуктов, реагирующих с ТБК-РП

Из таблицы 2 видно, что наибольшим антиоксидантным действием обладает ЛипК, во всех изученных концентрациях снижая содержание ТБК-РП относительно контрольных

значений: 50 мкМ – на 72,1%, 250 мкМ – на 74,4%, 1000 мкМ – на 76,8%. При этом с ростом концентрации от 50 мкМ до 1000 мкМ, содержание ТБК-РП снижалось незначительно. Эффективность антиоксидантного действия карнозина повышалась с увеличением концентрации, а ЛК наоборот снижалась, и в концентрации 1000 мкМ наблюдалось прооксидантное действие – содержание ТБК-РП увеличивалось на 11,3%.

Железо-индуцированная ХЛ

Данные о влиянии исследуемых соединений на уровень “быстрой вспышки” ХЛ (h) и на длительность латентного периода ХЛ (τ), представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что ЛипК в низкой концентрации (50 мкМ) более эффективно предотвращал рост липидных гидроперекисей по сравнению с карнозином (на 20,4%) и ЛК (на 9,3%). В концентрации 250 мкМ веществ в пробе их эффективность была сопоставима. В более высокой концентрации (1000 мкМ) эффективность синтезированного соединения была сопоставима с действием ЛК, а относительно карнозина была ниже на 26,8%.

Карнозин увеличивал длительность латентного периода ХЛ относительно контроля, начиная с 250 мкМ, пропорционально его концентрации в пробе (250 мкМ – на 31,5%, 1000 мкМ – на 64,7%). ЛК способствовала увеличению длительности

Таблица 2. Влияние исследуемых соединений на накопление ТБК-РП в условиях индукции образования активных форм кислорода (нмоль/мл)

Концентрация исследуемых соединений, мкМ	Концентрация ТБК-РП			
	Карнозин, мкМ	ЛК, мкМ	ЛипК, мкМ	ФХ (контроль)
50	14,90±0,44*	8,84±0,44*	5,69±0,28*	20,42±1,02
250	9,29±0,48*	9,64±0,48*	5,23±0,26*	
1000	4,34±1,14*	22,72±1,13	4,74±0,24*	

Примечание: * - $p < 0,01$ по отношению к ФХ.

Таблица 3. Влияние исследуемых соединений на измеряемые параметры ХЛ: уровень “быстрой” вспышки (h) и длительность латентного периода (τ)

Концентрация (мкМ)	h, в % к контролю			τ, в % к контролю		
	Карнозин	ЛК	ЛипК	Карнозин	ЛК	ЛипК
50	98±2	86±3	78±4,5 * [#]	105,5±5,5	100	151±14* [#] +
250	70±4*	68±1*	64,5±2*	131,5±1,5*	100	189±24* [#] +
1000	44,5±1,5*	59±1*	60,8±5 * [#]	164,7±2,3* ⁺⁺	125±3*	233±20* [#] ++

Примечание: Результаты представлены по отношению к контролю, принятому за 100%. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по отношению к контролю; # - $p < 0,05$ по отношению к карнозину; + - $p < 0,05$, ++ - $p < 0,01$ по отношению к ЛК.

латентного периода ХЛ в концентрации 1000 мкМ (на 25% относительно контроля), в более низких концентрациях (50 мкМ или 250 мкМ) она не оказывала влияния на данный параметр ХЛ. ЛипК выявил наиболее выраженное влияние на увеличение этого параметра ХЛ при всех исследуемых концентрациях как относительно карнозина (50 мкМ – на 44%, 250 мкМ – на 44%, 1000 мкМ – на 86%), так и ЛК (50 мкМ – на 51%, 250 мкМ – на 89%, 1000 мкМ – на 86%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЛипК проявляет более высокую антиоксидантную активность во всех исследуемых концентрациях, он наиболее эффективно предотвращал рост ТБК-РП пропорционально концентрации в пробе, в то время как рост липидных гидроперекисей – только в низкой концентрации (50 мкМ) по сравнению с карнозином и ЛК.

Таким образом, новое производное двух природных антиоксидантов: α-липоевой кислоты и L-карнозина – ЛипК – характеризуется высокой антиоксидантной активностью, обусловленной способностью предотвращать рост первичных и вторичных продуктов липидного перекисления с использованием разных модельных подходов. Проведенное исследование прямой антиоксидантной активности дополняет литературные данные о его супероксид-перехватывающей активности в ксантин-оксидазной реакции. При этом в работе Nativi и соавт. не было проведено сравнение эффективности антиоксидантного действия ЛипК с карнозином, а эффективность антиоксидантного действия по сравнению с ЛК была ниже [20].

Определение устойчивости ЛипК к сывороточной карнозиназе и стабильности в водном растворе

Известно, что карнозин в организме подвергается гидролизу до β-аланина и L-гистидина карнозиназой сыворотки крови. Узнавание пептида ферментом

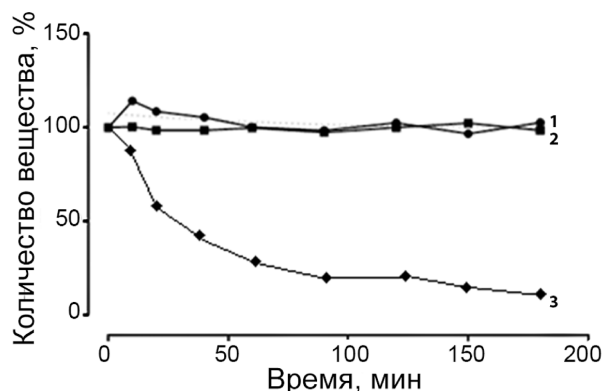


Рисунок 5. Кинетика гидролиза ЛипК карнозиназой, где: 1 - ЛипК + карнозиназа, 2 - ЛипК без карнозиназы, 3 - карнозин + карнозиназа.

происходит по непротеиногенной аминокислоте – β-аланину [28]. Из рисунка 5 видно, что, благодаря модификации по β-аланину, ЛипК сохраняет абсолютную устойчивость к гидролизу карнозиназой в течение 3 ч, в то время как карнозин за это время практически полностью гидролизует ферментом.

Полученные результаты указывают на высокую устойчивость ЛипК к гидролизу сывороточной карнозиназой.

Исследование стабильности ЛипК в водном растворе при продолжительном хранении показало, что в течение месяца ЛипК в водном растворе не подвергался разрушению при температуре 4-6°C.

Влияние ЛипК на жизнеспособность клеток культуры нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу

Анализ токсичности ЛипК был проведен на культуре нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, которая используется для создания клеточной

модели паркинсонизма. В диапазоне концентраций от 0,1 мМ до 5 мМ жизнеспособность клеток, оценённая по МТТ-тесту, была сопоставима с контрольными значениями, что указывает на отсутствие токсичности ЛипК (рис. 6). В работе [20] также было показано отсутствие токсического эффекта ЛипК на культуре астроцитов.

Отсутствие токсичности позволило провести оценку нейропротекторного действия ЛипК на клеточной модели паркинсонизма. В экспериментах *in vivo* паркинсонизм моделируют с помощью нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), избирательно поражающего нейроны nigrostriарного пути. Аналогом этой модели на клеточных культурах служит воздействие на клетки окисленной формы МФТП – 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП⁺). Нами была проведена оценка нейропротекторного действия ЛипК на дифференцированной по дофаминергическому типу культуре нейробластомы человека при введении МФП⁺. С помощью МТТ-теста было показано, что инкубация клеток с 2 мМ МФП⁺ в течение 24 ч приводит к снижению выживаемости на 22% относительно интактных клеток. ЛипК в концентрации 0,1 мМ и 0,25 мМ проявляет протекторное действие, повышая их жизнеспособность до 100%, обусловленное способностью ЛипК связывать свободные радикалы, образующиеся в условиях ОС, индуцированного МФП⁺ (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученное соединение липоилкарнозин (ЛипК) сочетает в себе два природных антиоксиданта – L-карнозин и α -липоевую кислоту (ЛК). Существенной характеристикой ЛипК является высокая устойчивость к гидролизу сывороточной карнозиной. По результатам оценки антиоксидантного действия по реакции с тиобарбитуровой кислотой и информативным параметрам железо-индуцированной хемилюминесценции было показано, что ЛипК обладает более выраженным антиоксидантным

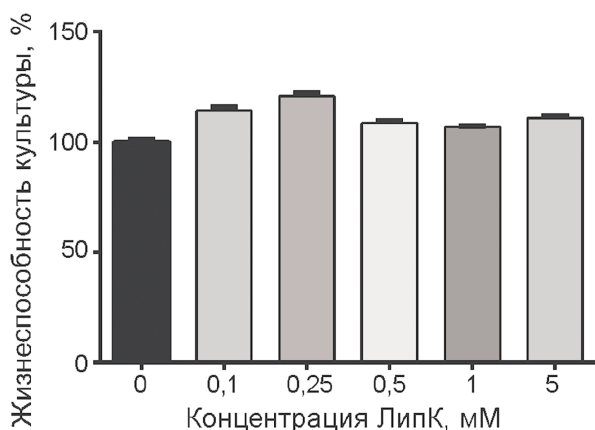


Рисунок 6. Влияние ЛипК в диапазоне концентраций в культуральной среде 0,1-5 мМ на выживаемость клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, определённое с помощью МТТ-теста. За 100% принято среднее значение в лунках с интактными клетками.

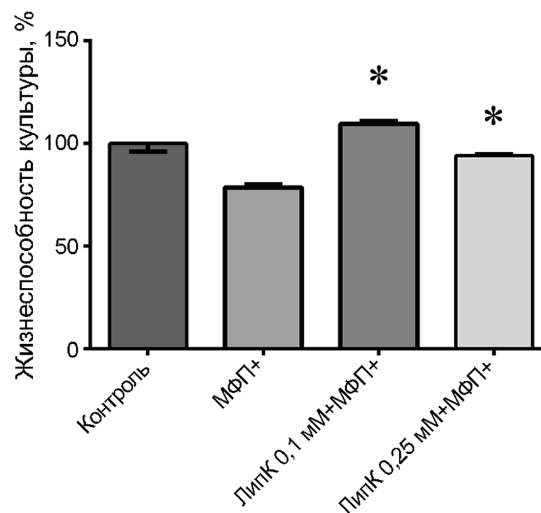


Рисунок 7. Цитопротекторное действие ЛипК в концентрациях 0,1 и 0,25 мМ на культуре нейробластомы человека в условиях индукции окислительного стресса, вызванного МФП⁺; * - $p < 0,05$, по отношению к клеткам с МФП⁺.

действием, по сравнению с карнозином и ЛК. На клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу, было доказано отсутствие цитотоксичности в концентрациях до 5 мМ и выявлено нейропротекторное действие в модели МФП⁺-индуцированной гибели клеток, моделирующей повреждение дофаминергических нейронов при паркинсонизме. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что выявленные преимущества ЛипК по сравнению с карнозином и ЛК открывают перспективу дальнейших исследований его протекторного действия на различных экспериментальных моделях патологий, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

- Halliwel B., Rafter J., Jenner A. (2005) Am. J. Clin. Nutr., **81**, 268S-276S.
- Rizvi S.I., Jha R. (2011) Expert. Opin. Drug. Discov., **6**, 89-102.
- Cross C., Halliwel B., Borish E., Pryor W., Ames B., Saul R., McCord J., Harman D. (1987). Ann. Intern. Med., **107**, 526-545.
- Baldeiras I., Santana I., Proença M.T., Garrucho M.H., Pascoal R., Rodrigues A., Duro D., Oliveira C.R. (2010) J. Alzheimer's Dis., **21**, 1165-1177.
- Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. (2010) Free Radic. Biol. Med., **49**, 1603-1616.
- Feruzi O., Miri R., Tavakkoli M., Saso L. (2011) Curr. Med. Chem., **18**, 3871-3888.
- Болдырев А.А. (2012) Биохимия, **77**, 403-418.
- Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. (2013) Physiol. Rev., **93**, 1803-1845.
- Федорова Т.Н., Беляев М.С., Трунова О.А., Гнездицкий В.В., Максимова М.Ю., Болдырев А.А. (2008) Биол. мембраны, **25**, 479-483.

10. Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bagyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. (2008) *Rejuvenation Res.*, **11**, 821-827.
11. Margolis F.L., Grillo M., Grannot-Reisfeld N., Farbman I. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 237-248.
12. Stvolinsky S.L., Bulygina E.R., Fedorova T.N., Meguro K., Sato T., Tyulina O.V., Abe H., Boldyrev A.A. (2010) *Cell. Mol. Neurobiol.*, **30**, 395-404.
13. Goraca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejska E., Skibska B. (2011) *Pharmacol. Rep.*, **63**, 849-858.
14. Bilka A., Wlodek L. (2005) *Pharmacol. Rep.*, **57**, 570-577.
15. Shay K.P., Morea R.F., Smith E.J., Smith A.R., Hagen T.M. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1149-1160.
16. Anti-Aging Complex (ALA/ALC/Carnosine/GSE) // Ray & Terry's Longevity Products (2011) © Copyright Ray and Terry's Health Products Inc. All Rights Reserved. info@rayandterry.com.
17. Giampapa V. (2006) US Patent 20060269617 A1.
18. Guasti P.L. (2013) US Patent 20120129781 A1.
19. Nativi C., Ghelardini C., Giancarlo La M., Dragoni E. (2013) US Patent 20130072533A1.
20. Nativi C., Gualdani R., Dragoni E., Di Cesare Mannelli L., Sostegni S., Norcini M., Gabrielli G., la Marca G., Richichi B., Francesconi O., Moncelli M.R., Ghelardini C., Roelens S. (2013) *Sci. Reports*, **3**, DOI:10.1038/srep02005
21. Антонова Н.А., Сорокоумова Г.М., Фёдорова Т.Н., Стволинский С.Л., Абаимов Д.А., Попенко В.И., Швец В.И. (2016) *Тонкие химические технологии*, **11**(6), 55-62.
22. Pegova A., Abe H., Boldyrev A. (2000) *Comp. Biochem. Physiol., part B, Biochem. Mol. Biol.*, **127**, 443-446.
23. Presgraves S.P., Ahmed T., Borwege S., Joyce J.N. (2004) *Neurotox. Res.*, **5**, 579-598.
24. Pahlman S., Ruusala A.I., Abrahamsson L., Mattsson M.E., Esscher T. (1984) *Cell Differ.*, **14**, 135-144.
25. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. (1988) *Cancer Res.*, **48**, 4827-4833.
26. Сорокоумова Г.М., Селищева А.А., Каплун А.П. (2001) *Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде. Учебное пособие по биоорганической химии*, МИТХТ, М., 68 с.
27. Фёдорова Т.Н. (2003) *Эксперим. клин. фармакол.*, **66**(5), 56-58.
28. Bellia F., Vecchio G., Rizzarelli E. (2014) *Molecules*, **19**, 2299-2329.

Поступила: 12. 03. 2018.
Принята к печати: 07. 05. 2018.

LIPOILCARNOSINE: SYNTHESIS, STUDY OF PHYSICO-CHEMICAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES, BIOLOGICAL ACTIVITY

S.L. Stvolinsky¹, N.A. Antonova², O.I. Kulikova^{1,3}, A.V. Lopachev¹, D.A. Abaimov¹, I. Al-Baidani², O.M. Lopacheva¹, T.N. Fedorova¹, A.P. Kaplun², G.M. Sorokoumova²

¹Research Center of Neurology,

80 Volokolamskoe shosse, Moscow, 115280 Russia; e-mail: slstvolinsky@mail.ru

²Moscow Technological University, Moscow, Russia

³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, International Biotechnological Center, Moscow, Russia

Synthesis of lipoilcarnosine (LipC) – a conjugated molecule based on two natural antioxidants, carnosine and α -lipoic acid, is described. Its physico-chemical, antioxidant properties and biological activity are characterized. According to reversed-phase HPLC with a UV detector, purity of the final product was 89.3%. The individuality of the obtained sodium salt of LipC was confirmed by tandem HPLC-mass spectrometry. High resistance of LipC to hydrolysis with serum carnosinase was demonstrated. The antioxidant activity of LipC measured by reaction with the formation of thiobarbituric acid reacting substances and kinetic parameters of iron-induced chemiluminescence was higher than that of carnosine and lipoic acid. LipC did not affect viability of SH-SY5Y human neuroblastoma culture cells, differentiated towards the dopaminergic type, at concentrations not exceeding 5 mM. At the concentration range of 0.1-0.25 mM LipC protected neuronal cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced toxicity.

Key words: carnosine; α -lipoic acid; lipoilcarnosine; antioxidant; carnosinase; parkinsonism