

Na-АЦЕТИЛКАРНОЗИН -ПРИРОДНЫЙ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИЙ ДИПЕПТИД КАК АНТИОКСИДАНТ ДЛЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

© 2000 г. *М.А. Бабичаев, В.Н. Ермакова, Ю.А. Семилетов, А. И. Деев*

¹ Innovative Vision Products, Inc. 3511 Silverside Road Suite 105,

County of New Castle, Delaware, USA. 19810

² Московский институт глазных болезней им. Г. Гельмгольца, 103064

Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19; факс: (7-095)977-2387

Природное соединение Na-ацетилкарнозин предложено как предлекарство L-карнозина, устойчивое к воздействию карнозиназы. Глаза кроликов обрабатывали 1%-ным раствором Na-ацетилкарнозина, L-карнозином либо плацебо (раствор-носитель), после чего определяли содержание имидазола в экстрактах водянистой влаги из передней камеры глаза с помощью аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращенной фазе, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ионообменной хроматографии. Показано, что местное введение в глаз кролика чистого L-карнозина не приводило к накоплению указанного соединения в водянистой влаге через 30 мин в концентрации, превышающей соответствующий уровень после введения раствора-носителя в парный контрольный глаз. В случае введения в глаз Na-ацетилкарнозина отмечали дозозависимый гидролиз указанного соединения по мере прохождения из роговицы в водянистую влагу с освобождением L-карнозина через 15-30 мин после введения в глаз предлекарства в серии терапевтических модальностей: инсталляция (закапывание) < субконъюнктивальная инъекция < ультра-звук-индуцированный форез. Применение различных терапевтических методов введения препарата выявило прекрасную толерантность глаза для 1%-ного Na-ацетилкарнозина. Попав в водянистую влагу, L-карнозин может действовать как антиоксидант и поступать в ткань хрусталика в эффективной концентрации 5-15 мМ. Преимущество офтальмологического предлекарства - Na-ацетилкарнозина и его биоактивируемого начала - L-карнозина - как универсальных антиоксидантов заключается в их способности создавать эффективную защиту против окислительного стресса как в липидной фазе биологических мембран, так и в водном окружении. Предполагается использовать Na-ацетилкарнозин для лечения глазных заболеваний, которые имеют компонент окислительного стресса в своем генезе (катаракты, глаукома, дегенерация сетчатки, заболевания роговицы, воспалительные процессы глаза, осложнения диабета, системные заболевания).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидант, природный дипептид, Na-ацетилкарнозин, предлекарство, L-карнозин, водянистая влага, хрусталик, катаракта, местное введение в глаз.

L-Карнозин (β -аланил-L-гистидин), впервые обнаруженный в мясном экстракте, является одним из наиболее распространенных (1-20 мМ) азотистых соединений безбелковой фракции скелетных мышц позвоночных и ряда других тканей, таких как обонятельный эпителий, обонятельные луковицы (0,3-5,0 мМ) и хрусталик глаза. Было показано, что некоторые родственные соединения, например анзерин (β -аланил-3-метил-L-гистидин), гомокарнозин (γ -аминобутирил-L-гистидин) и карцинин (β -аланилгистамин) присутствуют в миллимолярных концентрациях в некоторых тканях млекопитающих, в том числе в скелетных мышцах, тканях сердца и мозге, хотя существуют различия

тканевого распределения, активностей и метаболических превращений указанных соединений.

Из ранее опубликованных данных следует, что L-карнозин имеет значительный потенциал действия в качестве природного антиоксиданта: он способен перехватывать гидроксильные радикалы и утилизировать синглетный кислород, а также обладает липидной пероксидазной активностью. Благодаря этим свойствам карнозин можно применять для предотвращения или частичного обращения катаракты хрусталика глаза. Экзогенный карнозин, поступающий в организм путем внутривенного, интраперитонеального введения, с пищей или путем местного введения в глаз, не накапливается в тканях, а экскретируется с мочой или разрушается карнозиной - дипептидазой, присутствующей в плазме крови, печени, почках и других тканях, кроме мышц и, возможно, хрусталика.

N-Ацетильные производные гистидина, карнозина и анзерина присутствуют в сердечной мышце и скелетных мышцах млекопитающих и общая концентрация этих имидазольных соединений сопоставима с концентрацией L-карнозина в скелетных мышцах (~10 мМ). Имеются указания о применении фармацевтических композиций, содержащих алюминиевую соль Na-ацетилкарнозина, для лечения язв желудка.

Среди 29 дипептидов из семейства карнозина, испытанных в качестве потенциальных субстратов для препарата высокоочищенной сывороточной карнозины человека, Na-ацетилкарнозин и несколько других соединений не подвергались гидролизу, что позволяет ожидать пролонгирования физиологических ответов на терапевтические воздействия. Наличие эстеразной активности и особенно ацетилэстеразы (КФ 3.1.1.6) в роговице, радужной оболочке и цилиарном теле, а также наряду с эстеразной выявление N-ацетилтрансферазной активности подсказали внедрение L-карнозина для офтальмологического применения как антиоксиданта, т.е. в химически охарактеризованной Na-ацетилированной форме указанного дипептида. Благодаря своей относительной гидрофобности по сравнению с карнозином Na-ацетилкарнозин может проникать через роговицу постепенно после введения в глаз и дольше поддерживать концентрацию активного начала, достигающего водянистой влаги. В настоящей работе рассматривается вопрос, действует ли Na-ацетилкарнозин после местного введения в глаз как предлекарство (предшественник) L-карнозина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали L-карнозин производства «Neosystems Laboratories» (Франция). Химические и биологические реактивы фирмы «Sigma» (США), за исключением Na-ацетилированной формы L-карнозина, которая была получена путем ацетилирования исходного соединения. Растворители соответствовали качеству, используемому для ВЭЖХ. Остальные представленные соединения были квалификации ч.д.а. или более высокого качества.

Для определения физико-химических характеристик Na-ацетилкарнозина как чистого соединения получали ЯМР-спектры указанного соединения в D₂O на спектрометре Bruker MSL 200 (Германия), работающем на частоте 200 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Аналитическую ТСХ проводили на силикагелевых пластинах 60Н фирмы «Merck» (Германия) в системе растворителей хлороформ-метанол-25% аммиак (3:3: 1, по объему). Пластины проявляли хлортолидиновым реагентом. Полученный продукт имел значение R_f, равное 0,73. С помощью цифрового поляриметра D1P-360 JASCO (Япония) определяли значение [α], равное +17,0 (С 0,5, Н₂O) для указанного продукта. Элементный анализ соединения таков: рассчитано (%): С 41,0; Н 6,80; N 17,40; получено для C₁₁H₁₆N₄O₄ · 3H₂O (%): С 41,17; Н 6,97; N 17,70.

Na-Ацетилкарнозин и L-карнозин готовили в свежем виде путем растворения до 1%-ного раствора в стандартном фосфатном буфере Дульбекко (Dulbecco), рН 7,2-7,4, не

содержащем дивалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} («Gibco», США), того же состава, что и для работы с пептидами.

В работе использовали 14 серых кроликов породы шиншилла (3-4 месячных самцов, 28 глаз) массой 2-3 кг. Эксперименты с животными проводились в соответствии с основными положениями международной резолюции ARVO (Ассоциация по исследованиям зрения и офтальмологии) по использованию животных в исследованиях. За 15 или 30 мин до инцизии глаза (прокола роговицы) в правые глаза кроликов закапывали по 80 мкл 1%-ного раствора $\text{N}\alpha$ -ацетилкарнозина или 1%-ного раствора L-карнозина, а в контрольные (левые) глаза животных также инстиллировали (закапывали) раствор-носитель, не содержащий исследуемых соединений. В отдельных экспериментальных группах глаз тестируемые растворы соединений вводили в исследуемые или контрольные глаза путем однократной субконъюнктивальной инъекции (0,2 мл) или с помощью терапевтического ультразвук-индуцируемого метода (процедуры фонофореза).

Процедуру ультразвукового воздействия осуществляли под местной анестезией глаза растворами тримекаина (дикаина) (0,5%, 1-2 капли) за 5 мин до начала воздействия при интенсивности ультразвука 0,2 Вт/см² и частоте 880 кГц на ультразвуковой установке УЗТ-104 (Россия). В парные (контрольные) глаза кроликов вводили раствор носителя (плацебо), как указано выше.

Местную анестезию глаз кролика проводили путем закапывания 5%-ного раствора тримекаина (3 раза с интервалами 1,5-2,0 мин.). Для обеспечения анестезии век и двух вертикальных прямых мышц глаза вводили также 0,1 мл 0,5%-ного раствора новокаина путем субконъюнктивальной инъекции и инъекции в экстраокулярные ткани. После достижения анестезии веки раздвигали и фиксировали с помощью векодержателя, а глазное яблоко фиксировали с помощью пинцета в области нижней прямой мышцы. Инцизию (прокол тонкой иглой) проводили через роговицу (транскорнеально) на расстоянии 1,0-2,0 мм от лимба в верхнем височном (темпоральном) квадранте. Водянистую влагу (0,1-0,2 мл) аспирировали (извлекали) из передней камеры глаза кролика с помощью иглы калибра (25-gauge), соединенной с инсулиновым шприцем, и сразу же помещали в пробирки (Эппендорф) с добавлением этанола (0,8 мл) и хранили образцы на льду перед экстракцией.

Прозрачные хрусталики кролика извлекали из свежезнуклеированных глаз интактных животных. Во всех случаях сохранялась целостность капсулы хрусталика. Извлеченные хрусталики быстро ополаскивали в среде Хенкса в течение 20-30с и затем немедленно помещали во влажную камеру. Хрусталики использовали не позже, чем через 3 ч после получения. Указанная отсрочка не влияла на результаты эксперимента.

Поглощение L-карнозина хрусталиком. В отдельной серии экспериментов изучали кинетики проникновения L-карнозина в изолированные хрусталики кролика (исследовалось пять хрусталиков). Чтобы оценить способность хрусталика накапливать L-карнозин, его помещали в раствор L-карнозина (5 мМ или более высокой концентрации) в солевой среде Хенкса (без бикарбоната, pH 7,4), содержащей 7 мМ глюкозу, и инкубировали при комнатной температуре (20°). Через 1 ч проводили процедуру экстракции, чтобы выделить L-карнозин из небелковой фракции линзы. Выделенную небелковую фракцию фиксировали путем обработки реактивом 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1, 3-диазолом НБД-хлоридом), а затем подвергали ТСХ в системе растворителей этанол-вода (77 : 23). Концентрацию L-карнозина в пробе определяли спектрофотометрически, по характеристическому поглощению при 420/600 нм на двулучевом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Стандартные образцы карнозина использовали для количественного определения и мониторинга поглощения. Применение ТСХ для оценки уровня L-карнозина в хрусталиках глаза описано ранее.

Инкубация хрусталиков с липосомами. Для контроля вклада ионов металлов или потенциальных ловушек ОН-радикалов (например, глюкозы, присутствующей в ингибирующей концентрации в стандартных культуральных средах) применяли среду

культивации хрусталика, содержащую 10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl (pH 7,4), фосфат, но без глюкозы (среда А), и глюкозосодержащую среду, питательную для хрусталика, включающую 50 мМ Tris-HCl, 5,5 мМ глюкозу, 4,0 мМ KCl, 102,5 мМ NaCl, 1,0 мМ K₂HPO₄ (pH 7,2-7,4). Для обеих сред устанавливали осмотическое давление 290-300 мОсмоль с помощью NaCl и среды уравнивались 95% воздуха и 5% CO₂. При добавлении кислородных ловушек или других агентов в значительных концентрациях изменение осмолярности растворов компенсировали путем уменьшения количества NaCl, используемого для возвращения раствора к необходимой осмолярности после модификации. Хрусталики кроликов инкубировали в 3,0 мл среды на хрусталик при комнатной температуре. Тесты на сохранение целостности хрусталика в процессе инкубации, подтверждающие его нормальное функционирование, проводились как описано ранее. Когда было необходимо, инкубационная среда содержала суспензию липосом (0,5 мг/мл). Для измерения содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) фиксированные аликвоты среды (50-500 мкл) отбирались в заданные промежутки времени из органных культур хрусталиков. Общее время инкубации составляло 3 ч.

Экстракция имидазолов из водянистой влаги. Экстракции имидазол-содержащих соединений из аликвот водянистой влаги проводили согласно работе. Порции водянистой влаги добавляли к этанолу, как описано выше, и тщательно перемешивали (20°, 15 мин). Экстракты центрифугировали при 2000g в течение 15 мин, супернатанты отбирали и выпаривали досуха при пониженном давлении и нагревании не выше 40°, а затем ресуспендировали в фосфатном буфере (0,1 М N₂HPO₄, pH 7,0, 2,0 мл) и подвергали ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ. Обраточно-фазовую аналитическую ВЭЖХ проводили с помощью жидкостной хроматографической системы Gilson 714 («Gilson, Villiers Fe Bel», Франция). Растворенные, как описано выше, в фосфатном буфере образцы инъецировали в объеме 20 мкл на колонку (250 x 4,6 мм), наполненную носителем Partisil 5 мкм ODS-3 («Anachem Ltd», Великобритания). Элюцию с колонки проводили изократически фосфатным буфером (0,1 М N₂HPO₄, pH 2,1) при 20° в течение 25 мин со скоростью 1,0 мл/мин. Поглощение элюатов оценивали при 210 нм. На выходе система сопрягалась с процессором данных и оцениваемые площади под пиками использовались для предоставления данных по калибровке системы. В ходе последующих анализов в системе использовали накопленные хроматографические калибровочные данные для сравнения. Приведенные значения представляют собой средние величины ± стандартное отклонение, полученные после установления эффективности экстракции (см. «Результаты исследования»). Для калибровки использовали стандартные растворы L-карнозина, Na-ацетилкарнозина и других соединений.

Визуализация с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). После удаления водно-этанольного раствора под вакуумом экстракты водянистой влаги концентрировали и продукты биотрансформации Na-ацетилкарнозина идентифицировали с помощью ТСХ на силикагелевых пластинах 60Н («Merck»). Хроматографию проводили в системе хлороформ-метанол-25%-ный водный раствор аммиака (3:3: 0,5, либо 3:3:1, по объему) и окрашивали раствором нингидрина в ацетоне. В качестве контролей на пластину наносили стандартные пептиды, составные аминокислоты или лекарства, которые подвергались одновременному хроматографическому разделению.

Ионообменная хроматография. После депротеинизации образцов водянистой влаги, солюбилизации в этаноле и высушивания 100-200 мкл экстрактивных проб подвергали ионообменной хроматографии, используя аминокислотный анализатор Chromaspec («Rank Hilger», Великобритания), оснащенный колонкой Dowex с ионообменной смолой и двухканальным нингидриновым детектором. Каждое разделение калибровали стандартной смесью всех аминокислот (100 нмоль/мл каждая) и внутреннего стандарта β-тиенилаланина. Предел обнаружения составлял -14 нмоль на 1 мл пробы для каждой аминокислоты. Аминокислоты элюировали в стандартном режиме буферами с pH

в диапазоне 2,2-11,5, под давлением и при 40°.

Реакционная система перекисного окисления. Методики экстракции фосфолипидов, очистки и приготовления липосом (метод упаривания в обращенной фазе) были описаны ранее. Перекисное окисление фосфатидилхолина (ФХ, полученный из яичных желтков) инициировали путем добавления 2,5 мкМ FeSO₄ и 200 мкМ аскорбиновой кислоты к суспензии липосом (1 мг/мл) в 0,1 М Tris-HCl-буфере, pH 7,4. Инкубацию проводили при 37°. Исследуемые соединения (Nα-ацетилкарнозин и L-карнозин) добавляли в концентрации 10-20 мМ в систему Fe₂₊-аскорбат-индуцируемого перекисного окисления липосом из ФХ. Кинетики накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в окисленных липосомах измеряли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Реакцию ПОЛ останавливали введением ЭДТА до конечной концентрации 50 мкМ или добавлением 2,0 мл ледяной соляной кислоты (0,25 М), содержащей 15%-ную (масса/объем) ТХУ. Затем к реакционной смеси добавляли ТБК (0,125%) и смесь кипятили в течение 15 мин. Оценка по реакции с ТБК описана ранее. Дифференциальное поглощение продукта конденсации - малонилдиальдегида (МДА) - определяли спектрофотометрически при 535 и 600 нм. Используемые в данной работе соединения, генерирующие или улавливающие радикалы, не оказывали влияния на ТБК-реакцию как таковую. Для определения содержания диеновых конъюгатов липидные остатки образцов пропускали через хлороформ во время процедуры экстракции. Такая методика устраняет какие-либо водорастворимые вторичные продукты окисления, оставляя их в водно-метанольной фазе. Корреляцию концентраций экстрагированного липида и фосфора определяли, измеряя характеристическое поглощение липидного образца при 206-210 нм после растворения в 2-3 мл смеси метанол-гептан (5 : 1, по объему). Накопление общих диеновых конъюгатов, соответствующее уровню липидных гидроперекисей, оценивали из характеристического поглощения диеновых конъюгатов при ~ 230 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-260 (Япония). Поглощение вторичных продуктов ПОЛ при ~274 нм, соответствующее концентрации конъюгированных триенов и кетодиенов, также определяли спектрофотометрически из спектров поглощения липидных экстрактов. Молекулярную массу фосфолипидов принимали равной ~ 730 Да. Анализ статистической достоверности проводили с использованием непарного теста Стьюдента и значение $p = 0,05$ было принято за верхний предел достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакокинетика Nα-ацетилкарнозина и L-карнозина в глазах кролика (исследования in vivo). Гистидин-содержащие соединения водянистой влаги исследовали с помощью обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ (см. «Методы исследования») аналогично методике, использованной для разделения имидазол-содержащих аминокислот и дипептидов из мышц. Аминокислоты определяли по поглощению карбоксильной группы при 200 нм, а пептиды - по поглощению карбоксилата и пептидной связи (200-220 нм). Хроматограммы растворов L-карнозина и его синтезированного N-ацетильного производного показывают, что эти соединения хорошо разделяются. Порядок элюции соединений сопоставим с предполагаемым порядком на основе относительных гидрофобных свойств соединений. Хроматографическая система позволяет осуществлять мониторинг поведения в системе других гистидин-содержащих производных L-карнозина. Пики были однозначно идентифицированы путем сравнения времен удерживания соединений с таковыми для аутентичных стандартных соединений или для предполагаемого ацетилированного соединения, сходящего с колонки отдельно. Тесты на специфическую химическую реактивность обеспечили дополнительную идентификацию L-карнозина, анзерина и Nα-ацетилкарнозина. Профиль элюции при проведении ВЭЖХ экстракта водянистой влаги, полученный после инстилляцией 1%-ного Nα-ацетилкарнозина в глаз кролика подтверждает, что пик, характерный для L-карнозина,

имеет время удержания, ясно отличающееся от пика мертвого времени свободного объема колонки, и относится к обширному пику в области 3,59 мин. Идентифицированный пик L-карнозина перекрывается с несколькими меньшими пиками, соответствующими неидентифицированным соединениям (преимущественно аминокислотного или пептидного характера): данные процессора интегрируют дополнительные продукты экстракции с временами удержания от 3,58 до 3,62 мин. Данные по карнозин-соответствующему продукту (КСП) сопоставляли с контрольными данными по плацебо, вводимому в контралатеральные глаза животных. Пик в области 3,59 мин показывает асимметрию в интегрируемых концентрациях КСП (среднее значение \pm стандартное отклонение, приведенное к эффективности экстракции пяти измерений) после введения 1%-ного N α -ацетилкарнозина и плацебо в парные глаза. Это указывает, что основным имидазольным соединением глаза после введения 1%-ного N α -ацетилкарнозина является L-карнозин. Следовые количества N α -ацетилкарнозина обнаруживаются в хроматограмме водянистой влаги глаза после введения 1%-ного N α -ацетилкарнозина. Количественный ВЭЖХ-анализ пептидных составляющих в водянистой влаге выявляет достоверные отличия в концентрациях КСП в глазах после введения N α -ацетилкарнозина и плацебо. Концентрации имидазольных продуктов в водянистой влаге интактных глаз кролика и примечание «пик или продукт отсутствует» соответствуют фоновым значениям КСП, различным образом обнаруживаемым в экстрактах, полученных от нормальных животных. Различия значений, полученных для проб, взятых через 15 или 30 мин после инстилляций 1%-ного N α -ацетилкарнозина, свидетельствует о том, что высвобождаемый L-карнозин не накапливается в водянистой влаге в течение продолжительных интервалов времени, вероятно, за счет его поглощения окружающими тканями глаза (хрусталиком). Небольшие, но значимые различия в концентрации L-карнозина в водянистой влаге в зависимости от метода введения препарата в глаз находятся в соответствии с различиями в эффективности введения N α -ацетилкарнозина в нисходящем ряду эффективности: ультразвук - индуцируемый фрез > субконъюнктивальная инъекция > инстилляцией (капли). Через 30 мин после введения 1%-ного L-карнозина или плацебо (инстилляцией, субконъюнктивальной инъекцией) статистически достоверной разницы в концентрациях продукта со временем элюции, характерным для L-карнозина, не наблюдалось в парных глазах. Это указывает на то, что L-карнозин не обнаруживается в водянистой влаге в концентрациях, превышающих таковую, при введении плацебо (носителя) в глаз. В некоторых случаях после введения в глаз плацебо концентрации КСП оказывались даже выше, чем интегрированные концентрации КСП в глазах после введения L-карнозина. Возможно, часть L-карнозина в водянистой влаге быстро гидролизует (в течение 30 мин) сывороточной карнозиной.

L-Карнозин-соответствующий продукт содержит высокополярный материал с коротким временем удержания, который может интегрироваться с другими гидрофильными молекулами и элюироваться с медикаментами, применяемыми для местной анестезии глаз и потенциально попадающими в экстракт водянистой влаги. Дозозависимый ВЭЖХ анализ растворов тримекаина (дикаина) и новокаина в системе, использованной для обнаружения имидазольных соединений, показал, что времена удержания для молекул тримекаина (дикаина) составляют 3,51 мин и свыше 9 мин для соединений новокаина. Хотя ингредиенты тримекаина (дикаина) элюировались с временем удерживания, близким к КСП, они не элюировались совместно с L-карнозином и, таким образом, указанное имидазольное соединение в водянистой влаге могло хроматографироваться отдельно от контрольных примесей.

Экстракты аспирированной водянистой влаги изучались с помощью ТСХ и визуализировались с помощью специальных методов окрашивания функционально активных групп. После окрашивания пластин нингидрином с целью выявления как хроматографических фракций аутентичных соединений, так и их предполагаемых N-ацетильных производных оказалось, что ТСХ подтверждает данные ВЭЖХ-метода, не-

смотря на меньшую чувствительность ТСХ-метода. Свободные аминокислотные гистидиновые остатки отсутствовали в экстрактах водянистой влаги согласно данным ТСХ. В отдельных случаях обнаруживалась реактивность L-карнозина в водянистой влаге интактных глаз кролика. В пробах, полученных из глаз, через 30 мин после введения 1%-ного Na-ацетилкарнозина (инстилляция, Субконъюнктивальная инъекция, ультразвук-индуцированное введение) соединение L-карнозина выявлялось как розовато-лиловое пятно ($R_f = 0,10$) после разделения ТСХ в системе растворителей хлороформ-метанол-25%-ный водный аммиак (3:3: 0,5, по объему). Асимметрия появлений КСП в водянистой влаге после введения 1%-ного Na-ацетилкарнозина и в глазах после введения плацебо согласуется с аналитическими данными ВЭЖХ. Введение в глаз 1%-ного L-карнозина или плацебо обнаруживало слабое нингидриновое окрашивание на пластинках после ТСХ, близкое к стандарту L-карнозина ($R_f = 0,27$), а также примеси с более быстрой и медленной подвижностью аминокислотного и белкового характера после концентрирования водно-этанольных экстрактов и ТСХ разделения в модифицированной системе растворителей (3 ; 3 : 1, по объему). В парных глазах не отмечали существенных отличий в присутствии КСП или интенсивности его окрашивания, что указывает на отсутствие специфического накопления указанного дипептидного продукта в водянистой влаге из глаз после введения L-карнозина и плацебо. Использованный стандарт новокаина обнаружил значение $R_f 0,50$ в результате проявления хлортолидиновым реактивом.

Содержание L-карнозина и свободных аминокислот в экстрактах водянистой влаги также оценивалось с помощью аминокислотного анализа. В глазах после введения 1%-ного Na-ацетилкарнозина и плацебо уровни свободных аминокислот в водянистой влаге были сопоставимы с количествами L-карнозина. L-Гистидин, L-карнозин и их смесь имели совпадающие времена удержания во время проведения аминокислотного анализа. Поскольку данные ТСХ указывали на отсутствие заметных количеств свободного гистидина в экстрактах водянистой влаги, совокупность гистидил-содержащих соединений в образцах была преимущественно представлена продуктом L-карнозина. Данные указывают, что содержание L-карнозина в экстрактах водянистой влаги после введения в глаз 1%-ного Na-ацетилкарнозина имеет тенденцию к увеличению в следующем ряду применяемых модальностей: инстилляція < субконъюнктивальная инъекция < ультразвук-индуцированный форез. Различия в абсолютных значениях концентрации КСП между методами ВЭЖХ и аминокислотным анализом объясняются общим интегрированием площадей с помощью Chromatopac-ВЭЖХ-процессора, соответствующих пикам соединений, которые имеют времена удерживания 3,58-3,62 мин, почти совпадающие с L-карнозином. После введения 1%-ного Na-ацетилкарнозина и плацебо отмечались значительные различия в концентрациях КСП между образцами водянистой влаги из контралатеральных глаз при исследовании с помощью аминокислотного и ВЭЖХ анализов, направленных на выявление L-карнозина. Аминокислотный анализ также выявил, что уровень L-карнозина в водянистой влаге не увеличивается через 30 мин после введения в глаз 1%-ного L-карнозина, независимо от способа его введения, что согласуется с результатами хроматографических исследований.

Изучение фармакокинетики L-карнозина в хрусталике. В отдельной серии экспериментов изучали кинетики проникновения L-карнозина в хрусталик глаза. Для изучения кинетики проникновения L-карнозина в хрусталик изолированный хрусталик кролика помещали в среду, содержащую 5-15мМ L-карнозин. Инкубация препаратов хрусталика с гистидин-содержащим дипептидом приводила к его накоплению в ткани линзы. Предположительно L-карнозин проникает через барьер капсулы хрусталика, если он присутствует в водянистой влаге в указанных эффективных концентрациях. Определяли присутствие L-карнозина в прозрачных хрусталиках глаза и его концентрация в этом случае составляла 25 мкМ в нормальных хрусталиках человека и $0,89 \pm 0,1$ мМ ($n = 4$) - в хрусталиках кролика. На различных стадиях развития катаракты уровень L-карнозина снижался, достигая 5 мкМ в случае зрелых катаракт человека. Таким образом, L-карнозин,

попадая в водянистую влагу, способен накапливаться в ткани хрусталика в течение значительного периода времени.

Изучение действия окислительного стресса на изолированные хрусталики и антиоксидантные свойства L-карнозина и его производного N α -ацетилкарнозина.

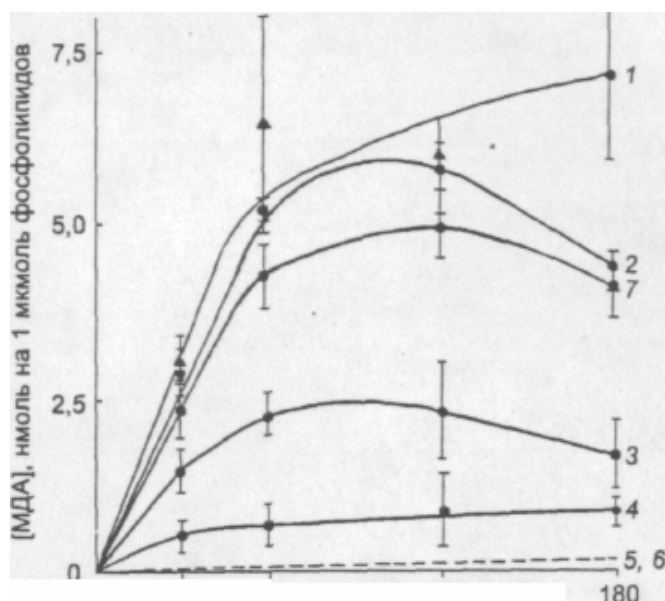
Сравнительная антиоксидантная активность N α -ацетилкарнозина и L-карнозина оценивалась в системе перекисного окисления липосом, катализируемого Fe $^{2+}$ + аскорбат.

Результаты показывают, что реакции ПОЛ в модельной системе липидных мембран значительно ингибируются L-карнозином. Эффективные концентрации L-карнозина составляют 10 и 20 мМ. Данные по биологической эффективности L-карнозина как антиоксиданта, предотвращающего перекисное окисление ФХ липосом или линолевой кислоты в диапазоне физиологических концентраций 5-25 мМ, были опубликованы ранее. Видно, что уровень ТБК-реактивных продуктов, достигнутый к 5 мин инкубации, уменьшается в присутствии L-карнозина (10 или 20 мМ) к 10 мин и в более поздние временные интервалы (20 мМ). Это происходит за счет потери существующих ТБК-активных продуктов или перекисных предшественников МДА, а не за счет снижения образования перекисных соединений. Способность гистидин-содержащего соединения N α -ацетилкарнозина ингибировать Fe $^{2+}$ + аскорбат-индуцируемое окисление ФХ липосом сравнивалось с таковой для эквимоллярных концентраций L-карнозина. Антиоксидантная активность 10 и 20 мМ N α -ацетилкарнозина соответствовала 38 и 55% ингибированию ПОЛ для каждой концентрации после 60 мин инкубации. N α -ацетилкарнозина проявлял антиоксидантную защиту в меньшей степени, чем L-карнозин, соответствуя 60%- и 87%-ному ингибированию эквимоллярных (10 или 20 мМ) концентраций L-карнозина. Однако, поскольку N α -ацетилкарнозина способен быстро метаболизироваться в L-карнозин, проходя через роговицу в водянистую влагу, антиоксидантная активность N α -ацетилкарнозина *in vivo* значительно возрастает. Оказавшись в водянистой влаге, L-карнозин способен противостоять ПОЛ в хрусталике.

Биологическую эффективность L-карнозина как специфической ловушки активных форм кислорода оценивали в индуцированной хрусталиком системе ПОЛ. Прозрачные хрусталики кролика инкубировали в различных средах, содержащих в качестве субстрата окисления суспензию липосом в концентрации 0,5 мг/мл. Кинетики реакции ПОЛ оценивали по измерению МДА, липосомальных диеновых конъюгатов и триенов, делая соответствующие поправки на автоокисление липосом. В базовом исследовании в отсутствие хрусталика окисление липосом фактически не происходило в течение 180 мин (рис. 1, кривая б). Однако в присутствии хрусталика в липосомах наблюдалось значительное увеличение концентрации различных молекулярных продуктов ПОЛ в течение соответствующего времени инкубации как без глюкозы, так и в глюкозосодержащей культуральной среде (рис. 1, кривая 1). Уровень накопления МДА после инкубации хрусталиков кролика в течение 3 ч был в 3,5 и в 5,3 раза выше, чем после инкубации нормальных хрусталиков человека или мышинных хрусталиков соответственно. Большие нормальные хрусталики (кролика или человека) имеют больше эпителиальных клеток, богатых GSH (восстановленный глутатион), которые являются первично метаболически активными. Эти хрусталики способны генерировать активные формы кислорода и липидные перекиси быстрее, чем катарактальные хрусталики, имеющие истощенный пул восстановителей, или маленькие мышинные хрусталики. В экспериментах наблюдалось некоторое снижение концентрации МДА в липосомах после инкубации в течение 2 ч, что может быть связано с утилизацией МДА самим хрусталиком (взаимодействие МДА с аминокислотной группой или снижение уровня МДА альдегиддегидрогеназой хрусталика). Значительное уменьшение скорости накопления продуктов ПОЛ в липосомах наблюдалось после добавления каталазы (900 ед. на 1 пробу) (рис. 1, кривая 3), что свидетельствует о роли перекиси водорода в развитии ПОЛ хрусталиком. Добавление супероксид-дисмутазы (СОД, 114 ед. на 1 пробу) в инкубационную среду хрусталика приводило к значительному уменьшению уровня липосомального МДА (рис. 1, кривая 4),

что указывает на способность хрусталика генерировать супероксидные анион-радикалы в окружающую среду. Добавление комплекса аденозиндифосфат-железо ($ADP-Fe^{3+}$) к инкубационной среде хрусталика снижало накопление в липосомах ТБК-реактивного материала на 33-50%, что свидетельствует о распаде аккумулированных ТБК-активных продуктов. Почти полное ингибирование ТБК-реактивности в липосомах происходило после добавления хелатирующего агента (ЭДТА, 1 мМ), который устраняет свободные и доступные ионы металлов из системы ПОЛ (рис. 1, кривая 5). Недавно показано, что L-карнозин может действовать как ловушка липидных пероксильных ($LOO\cdot$) и гидроксильных ($OH\cdot$) радикалов. Присутствие 5 мМ L-карнозина в среде, содержащей хрусталик кролика/липосомы, снижало ТБК-реактивность в липосомах на ~25% к 2 ч инкубации (рис. 1, кривая 7).

Рис. 1. Действие различных ловушек кислородных радикалов на образование липидных перекисей в липосомах после добавления в среду инкубации нормального хрусталика глаза кролика: 1 - хрусталик кролика; 2 - $FeCl_3$ (0,1 мМ) + ADP (1 мМ); 3 - каталаза (900 ед. на 1 пробу); 4 - супероксиддисмутаза (114 ед. на 1 пробу); 5 - ЭДТА (1 мМ); 6 - липосомы; 7 - L-карнозин (5 мМ). Общий объем -3,0 мл инкубационной смеси среды, включающий хрусталик, содержал 0,5 мг/мл суспензии липосом и ловушку в указанных концентрациях. Приведены средние значения концентраций МДА для представительного эксперимента с ошибкой, указывающей стандартное отклонение в каждой группе из трех-пяти хрусталиков



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

L-Карнозин приемлем в терапии и профилактике катаракты как водорастворимый антиоксидант, ингибирующий окислительную модификацию белков, накопление повреждений ДНК и утилизирующий липидные перекиси в хрусталике как предшественники помутнения линзы. Однако потенциальные физиологические и антиоксидантная активности L-карнозина *in vivo* ограничены его чувствительностью к гидролизу цитозольной и сывороточной карнозиназам. Последняя, являясь уникальной дипептидазой, специфична для дипептида с аминокислотной группой одного из остатков в необычном β -углеродном положении. Настоящее исследование демонстрирует способность $N\alpha$ -ацетилированной формы L-карнозина действовать как предлекарство, устойчивое к гидролизу сывороточной карнозиназой человека в фармацевтических композициях для офтальмологического применения, таких как растворы, эмульсии, офтальмологические гели, капли или мази. Поскольку уровень карнозидазы увеличивается в сыворотке с возрастом и деацетилированные формы карнозина и анзерина гидролизуются в токе крови, $N\alpha$ -ацетилкарнозин может быть использован для лечения старческой

катаракты как офтальмологическое предлекарство, а не как парентеральный раствор, применяемый для офтальмологических целей. Принимая во внимание физиологические и антиоксидантные активности L-карнозина, для данного соединения могут быть предложены различные формы предлекарств, в частности, полученные путем ацилирования функциональных групп L-карнозина, используемого для лечения офтальмологических заболеваний, чтобы продлить и увеличить антиоксидантные активности, характерные для данного дипептида. Однако особенности проникновения возможных предлекарств L-карнозина в водянистую влагу и их накопление в тканях глаза пока не изучены.

Данные настоящей работы показывают, что местное введение чистого L-карнозина (1%-ный раствор) в глаз кролика (инстилляцией, субконъюнктивальная инъекция) не приводит к накоплению указанного природного соединения в водянистой влаге через 30 мин в концентрациях, превышающих таковую в парных глазах после введения плацебо, а эффективная антиоксидантная концентрация L-карнозина снижается еще быстрее. Результаты также свидетельствуют о способности N α -ацетилкарнозина гидролизиться и высвободить L-карнозин во время своего прохождения через роговицу в водянистую влагу в течение 15-30 мин после местного введения в глаз N α -ацетилкарнозина. Используемые методы введения в глаз обеспечивали прохождение через роговицу N α -ацетилкарнозин (предлекарства) и его биотрансформацию в L-карнозин (активное начало), и при этом L-карнозин поступает в водянистую влагу. Применение различных методов введения выявило высокую толерантность глаза для 1%-ного N α -ацетилкарнозина. Полученные данные свидетельствуют о том, что, попав в водянистую влагу, L-карнозин может действовать как антиоксидант и действительно поступать в ткань линзы, присутствуя в эффективных концентрациях (5-15 мМ). Хотя считается, что L-карнозин и родственные ему соединения - анзерин и гомокарнозин - присутствуют и функционируют преимущественно в мышцах человека, обонятельном эпителии и луковицах, существенные количества L-карнозина обнаружены в прозрачных хрусталиках человека; при зрелых катарактах концентрации L-карнозина в хрусталиках значительно снижаются. Это указывает, что хрусталик глаза является специфическим участком защитного действия L-карнозина против свободнорадикального повреждения его тканей, подвергающихся окислительному стрессу. Представленные эксперименты и другие исследования показывают, что L-карнозин обеспечивает значительную защиту от перекисных факторов в зоне, окружающей хрусталик глаза, и тканях хрусталика, присутствуя в миллимолярных концентрациях. Указанная антиоксидантная защита потенциально увеличивается при больших концентрациях L-карнозина. N-Ацетильная форма L-карнозина проявила умеренную антиоксидантную активность *in vitro*, менее выраженную, чем у активного начала L-карнозина. Однако форма предлекарства может играть важную роль в защите против повреждения липидных мембран, индуцированном окислительным стрессом *in vivo* в ходе биотрансформации в L-карнозин в глазу. Большинство известных биологических антиоксидантов, способных предотвращать окислительное повреждение липидов, белков, ДНК и других важных макромолекул, проявляет некоторую специфичность в своем механизме действия и, таким образом, антиоксиданты способны обеспечивать только один тип защиты. Эксперименты, представленные в настоящем исследовании в системе Fe $^{2+}$ аскорбат-индуцированного ПОЛ, указывают, что L-карнозин способен проявлять свои антиоксидантные свойства, удаляя высоко реактивные перекисные соединения из липидной фазы. Исходя из того, что L-карнозин и N α -ацетилкарнозин проявляли свое защитное действие путем предотвращения накопления как водорастворимых ТБК-активных продуктов, так и липидных производных продуктов ПОЛ (диеновые и триеновые конъюгаты), мы полагаем, что преимущество N α -ацетилкарнозин и L-карнозина как универсальных антиоксидантов связано с их способностью обеспечивать эффективную защиту от накопления продуктов ПОЛ как в липидной фазе биологических мембран, так и в водном окружении. Различные защитные

антиоксидантные ферменты, такие как СОД или каталаза, способны только реагировать со своими субстратами в водном окружении. Антиоксидантная активность L-карнозина и его ацетилированного производного, а также данные по фармакокинетике указанных соединений предполагают применение N α -ацетилкарнозина для лечения глазных заболеваний, имеющих компонент окислительного стресса в патогенезе, таких как старческая и возрастная катаракты, первичная открытоугольная глаукома, дегенерация сетчатки, заболевания роговицы, воспаление глаза, осложнения диабета или другие системные заболевания. Применение 1%-ного N α -ацетилкарнозина может эффективно сочетаться с офтальмологическим введением других медикаментов, таких как β -блокаторы для лечения первичной открытоугольной глаукомы. Учитывая все сказанное, мы считаем, что дальнейшее внимание должно быть направлено на развитие перспектив применения N α -ацетилкарнозина в офтальмологии.