

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ КАРНОЗИНА

© 2000 г. А.А. Болдырев

*Международный биотехнологический центр МГУ  
им. М.В. Ломоносова (Кафедра биохимии),  
119899 Москва; факс: (7-095)939-1398,  
электронная почта: [aab@genebee.msu.su](mailto:aab@genebee.msu.su)*

Открытие карнозина в составе мышечной ткани, сделанное В.С. Гулевицем в 1900 г., поставило перед исследователями проблему его биологической активности. Изучение феноменов, присущих этому дипептиду, осуществлялось параллельно с исследованием механизмов его вовлечения в метаболизм клетки. К настоящему времени продемонстрирована способность карнозина защищать клетки от окислительного стресса, а также увеличивать их устойчивость при избыточной функциональной нагрузке и при накоплении возрастных изменений. Механизм этой защиты связан со способностью молекулы являться буфером протонов и металлов переменной валентности, а также нейтрализовать активные формы кислорода и Сахаров, накопление которых в тканях при неблагоприятных условиях модифицирует макромолекулы и нарушает нормальное течение метаболизма. Различные производные карнозина обладают разной скоростью ферментативного расщепления и разной эффективностью действия, поэтому биологическое значение ферментативных превращений карнозина в тканях может заключаться в обеспечении наиболее эффективной защиты клеток от неблагоприятных факторов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** карнозин, метаболические превращения, возбудимые ткани, окислительный стресс, подвижный буфер протонов, клеточные антиоксиданты.

*Природа - сфинкс, и тем она верней  
своим искусом губит человека,  
что, может статься, никаких от века  
загадок нет и не было у ней.*

*Ф.И. Тютчев*

Открытие карнозина ( $\beta$ -аланил-L-гистидина) и установление его структуры относится к самому началу XX в. Это был первый и простейший пример биологически активного пептида (дипептида), открывший длинный список известных ныне природных белковых регуляторов метаболизма. После первых десятилетий исследования структуры, распространения и свойств этого соединения автору этого открытия В.С. Гулевичу стало совершенно ясно, что это важное соединение имеет непосредственное отношение к функции возбудимых тканей (к тому времени было исследовано распространение карнозина и родственных ему соединений только в мышечной ткани, в мозге позвоночных они были обнаружены позже. Иллюстрацией этой роли карнозина можно было считать корреляцию его уровня с функциональной активностью мышц, приуроченность его появления к определенной стадии онтогенеза, наличие специфических ферментов синтеза и метаболических превращений. Эти данные накапливались постепенно усилиями учеников В.С. Гулевича и впервые были систематизированы С.Е. Севериным в пленарном докладе на VI Международном биохимическом конгрессе в Нью-Йорке в 1964 г. Первым указанием на биологическую значимость карнозина как эффективного биологического рН-буфера была публикация Бейт-Смита. Эта идея была развита В.П. Скулачевым, обосновавшим важность подвижного буфера протонов для активно гликолизирующих тканей, и Х. Абе, который сделал расчет буферной емкости, обеспечиваемой карнозином и родственными ему дипептидами в мышечной ткани. Обнаруженная способность карнозина образовывать комплексы с ионами меди, железа, кобальта дополняла его функциональную роль возможностью регулировать концентрацию этих металлов в биологических жидкостях и тканях.

Дальнейшие исследования биологической роли карнозина и его природных производных показали, что рН-буферная функция не является единственным проявлением

их биологической активности. Было неоднократно замечено, что существенная часть карнозина в мышцах связана с белками - состояние, которое затрудняло выполнение им функции подвижного буфера протонов. Более того, оказалось, что некоторые биологические свойства карнозина (например, способность поддерживать жизнедеятельность клеток в культуре) не присущи его D-изомеру, обладающему такой же рН-буферной емкостью. В 1953 г. С.Е. Северин и соавт. описали феномен устранения мышечного утомления при внесении карнозина в среду, окружающую работающую мышцу. Этот эффект был присущ и его Nl-метилованному производному - анзерину и, если исходить из условий эксперимента, не зависел от рН-буферных свойств молекулы. Механизм этого феномена, получившего в литературе название «феномен Северина», долгое время оставался непонятным, тем не менее, «тайна» биологической активности карнозина указывала на его специфическое участие в мышечном метаболизме.

Разнообразные гипотезы привлекались для объяснения такого участия. Предполагали его роль в качестве депо гистидина и  $\beta$ -аланина, но эта гипотеза оказалась несостоятельной, поскольку карнозинсинтаза и карнозиназа - ферменты, обеспечивающие образование карнозина и его расщепления на составные части, вовлекаемые в метаболизм, локализируются в различных структурах, так что клеточные запасы карнозина в основном не доступны для гидролиза. Обсуждалась медиаторная роль карнозина в некоторых отделах мозга, но специфические рецепторы для карнозина не были обнаружены. И хотя показаны высвобождение карнозина из культивируемых нейрональных клеток при их возбуждении, а также совместная локализация карнозина в мозге с глутаматергической системой, эти факты скорее отражали способность карнозина устранять токсическую компоненту в медиаторной функции глутамата.

Более того, с 1964 г. до настоящего времени накапливалось все больше данных о защитном действии карнозина на целый ряд ферментов и ферментных комплексов, в числе которых такие различные по механизму действия системы, как дегидрогеназы, фосфорилаза, АТРазы, а также ионные насосы. Было продемонстрировано защитное действие карнозина на мембранные структуры митохондрий, саркоплазматического ретикулума, а позже - на переживающие нейроны и фибробласты. Было сформулировано, что карнозин и другие дипептиды препятствуют порче или восстанавливают поврежденную функцию биологических структур.

Рассмотрение защитного эффекта карнозина следует начать с опытов Е.А. Нейфаха. По мнению Нейфаха, обнаружившего отсутствие корреляции между запасами известных антиоксидантов в мышцах и интенсивностью индуцированного перекисного окисления их мембран, карнозин может обеспечивать дополнительную резистентность клеток к окислению за счет восстановления клеточного фонда атокоферола, переходящего в окисленную форму в процессе защиты от радикальной атаки. Однако Н.В. Горбунов и А.Н. Ерин показали, что карнозин не способен регенерировать окисленную форму  $\alpha$ -токоферола. Кроме того, запас токоферола в мышцах относительно мал. В противоположность этому было обнаружено прямое взаимодействие карнозина с молекулярными продуктами окисления липидов (рис. 1), а также с супероксид-анионом кислорода (рис. 2, а) и с гидроксид-радикалом (рис. 2, б).

Возвращаясь к феномену Северина, следует подчеркнуть, что основное звено электромеханического сопряжения в утомленной мышце, которое испытывало защитное действие карнозина, было представлено Са-насосом саркоплазматического ретикулума, который ингибировался продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), а карнозин, как и анзерин, препятствовал этому эффекту (рис. 3). Таким образом, из совокупности многих фактов возникла концепция о биологической роли карнозина, как гидрофильного антиоксиданта, понижающего в клетках уровень свободных радикалов [20, 21]. Количественная оценка взаимодействия карнозина с основными кислородными радикалами показывает (табл. 1), что в его присутствии скорость нейтрализации радикалов протекает в несколько раз эффективнее. Правда, по сравнению с аскорбатом

или  $\alpha$ -токоферолом карнозин не является особо выдающимся антиоксидантом, однако, принимая во внимание его тканевые концентрации, следует заключить, что антиоксидантная роль карнозина в возбудимых тканях весьма существенна.

Карнозин образует с супероксид-анионом кислорода комплекс с переносом заряда, токсичность этого радикала в комплексе снижается, а время его жизни возрастает. Это свойство приводит к «забуфериванию» концентрации свободнорадикальных соединений в тканях на достаточно низком, но измеримом уровне и не мешает выполнению ими своих регуляторных, сигнальных или иных важных функций. Исходя из этих фактов, можно было предположить особую важность карнозина для тканей, использующих кислородные радикалы для регуляторных целей. Так, для мозгового кровообращения пара NO - супероксид-анион является регулятором кровообращения, NO обеспечивает вазодилатацию, а супероксид - вазоконстрикцию сосудов. При нарушении кровообращения мозга (например, при ишемическом повреждении) появление супероксид-аниона кислорода будет приводить к нейтрализации действия NO в силу их взаимодействия, приводящего к образованию активного окислителя пероксинитрита. В этих условиях карнозин, связывая супероксид-анион, будет как препятствовать нежелательному образованию пероксинитрита, так и проявлять положительный эффект на кровоснабжение мозга, что и было показано в эксперименте. Сравнение действия карнозина на накопление продуктов ПОЛ и на активность Са-насоса выявляет дополнительный защитный эффект (рис. 3). Так, в контроле инактивация Са-насоса наблюдается к 10 мин регистрации, когда в пробе накапливается 20 нмоль малонового диальдегида (МДА) на 1 мг белка. Такой же уровень МДА в присутствии карнозина достигается лишь к 30 мин, однако и в этих условиях Са-насос еще способен функционировать с приемлемой скоростью. Это прямо свидетельствует, что эффект карнозина не ограничивается подавлением ПОЛ. Таким образом, мембранопротекторное действие карнозина связано не только с антиоксидантной способностью молекулы.

Аналогичный защитный эффект карнозина на клеточные структуры был обнаружен и в условиях осмотического шока клеток, не связанного с активными формами кислорода (АФК), а также при росте клеточных культур. Эти эффекты иллюстрировали способность карнозина препятствовать действию накапливающихся токсических продуктов метаболизма клеток. Во всех этих случаях карнозин выступал как фактор, повышающий устойчивость к неблагоприятным условиям, препятствуя гибели клеток, каким бы способом она не развивалась - по пути некроза или апоптоза (табл. 2). В то же время N-ацетилкарнозин, который обладал схожей способностью подавлять внутриклеточный уровень АФК, не увеличивал жизнеспособность нервных клеток.

Все эти факты нашли свое объяснение в способности карнозина защищать клеточные структуры от альдегидов, избыток которых оказывает токсический эффект, поскольку приводит к неферментативному гликозилированию белков, осуществляемому при массивной альдегидной атаке. Этот процесс, называемый «гликированием», модифицирует преимущественно  $\epsilon$ -аминогруппу лизина, если в белковой молекуле он соседствует с пролином. Возможно, что именно структурное сходство  $\alpha$ -аланил-гистидина с лизил-пролином позволяет карнозину успешно конкурировать за гликирующий агент, сохраняя молекулы белка от модификации. Такое действие карнозина может полностью защитить клеточные белки от альдегидной атаки и, возможно, именно оно является ведущим фактором, обеспечивающим противодействие клетки осмотическому шоку, окислительному стрессу или разрушающим эффектам продуктов метаболизма, накапливающихся в клеточной культуре. Действительно, присутствие карнозина может препятствовать накоплению в клетках продуктов Амадори (образуемых при перегруппировках продуктов первичного гликирования), а также и образованию поперечных сшивок между макромолекулами. Такой эффект карнозина проявляется при высоких концентрациях, что и объясняет большую потребность в нем возбудимых тканей. В очень высоких концентрациях карнозин может не только препятствовать гликированию

белков, но и обращать эту, в принципе трудно обратимую реакцию, обеспечивая «реювенильный эффект». Показанное ранее просветляющее действие карнозина на хрусталик глаза, пораженный старческой катарактой (развитие которой является прямым следствием образования поперечных сшивок между кристалликами в условиях истощения антиоксидантной защиты), было, по-видимому, первой демонстрацией такого репарирующего влияния карнозина на ткани животных. Недавно оно воспроизведено на человеке. Вся совокупность этих фактов уже не делает удивительным описанный С. Галлантом и соавт. существенный геропротекторный эффект карнозина при его внесении в диету в виде пищевой добавки, -эффект, не воспроизводимый смесью гистидина и β-аланина.

Неясным остается биологический смысл превращения карнозина в различные его производные, осуществляющегося ферментативным путем. Одно из возможных объяснений вытекает из различий в их эффективности в качестве антиоксидантов. На рис. 4 проведено сопоставление защиты от окисления липопротеинов плазмы крови человека карнозином и его производными. Видно, что анзерин обладает наибольшей, ацетилкарнозин - наименьшей и карнозин - промежуточной активностью. Таким образом, для изменения антиоксидантного статуса клетки достаточно модифицировать молекулу карнозина с помощью имеющихся ферментов - ацелирование карнозина будет снижать, а метилирование - увеличивать способность клеток сопротивляться окислительному стрессу. Более того, модификация молекулы карнозина может изменять ее антигликирующую активность. Вероятно, именно с этим связана утрата способности молекулы карнозина защищать нейроны от апоптоза после его ацелирования. Хотя N-ацетилкарнозин и остается похожим на карнозин по своему антиоксидантному действию (определяемому свойствами имидазольного кольца), все же он утрачивает способность защищать белки от гликирования из-за маскировки своей аминогруппы. Таким образом, карнозин и родственные ему соединения могут рассматриваться в качестве дополнительных регуляторов реакций, управляющих клеточной смертью.

Представляет интерес и другая сторона проблемы. Ни карнозин, ни родственные ему ди-пептиды не подвергаются разрушению обычными пептидазами, а гидролизуются специфической карнозиной. Обе изоформы карнозиной (локализованные в плазме крови и в почках) проявляют высокую скорость гидролиза только в отношении карнозина. Анзерин и офидин гидролизуются заметно медленнее, а гомокарнозин, карцинин и N-ацетилкарнозин вообще не могут использоваться в качестве субстратов (табл. 3). Следовательно, метаболические превращения карнозина могут предохранить его от ферментативного расщепления.

Таким образом, современные представления о роли карнозина и родственных ему соединений включают в его биологические функции регуляцию внутриклеточной концентрации протонов, свободных радикалов, ионов металлов переменной валентности, а также активных Сахаров, обеспечивающих контроль известных регуляторных механизмов, управляющих стабильностью клетки. С этих позиций кажется понятной исключительная локализация этих соединений в возбудимых тканях, определяющих жизненно важные функции организма.

Работа суммирует исследования, проводимые автором и его сотрудниками в Международном биотехнологическом центре МГУ им. М.В. Ломоносова и в Институте неврологии РАМН; она поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 95-04-11969, 96-04-49078, 99-04-49420) и Межправительственной Российско-Японской научной программой «Конформация макромолекул и сигнальные нейропептиды».

Таблица 2. Влияние карнозина (1 мМ) на эксайтотоксич! кую смерть нейронов мозжечка крысы, индуцируемую N-метил-D-аспаратом (NMDA, 1 мМ) или каинатом (1 мМ)

эксперимента	Распределение нейронов, %		
	живые	некроти- ческие	апоптоз-
Контроль	79 ±5	6±3	1515
NMDA	64±3	7±2	29 ±5
(30 мин) + карнозин	76 ±5	9±4	15±3
Каинат	54 ±4	7±3	3916
(60 мин) + карнозин	70 ±3	11 ±5	19 ±4

Таблица 3. Гидролиз карнозина и родственных соединений почечной карнозиназой в присутствии (А, Б) и в отсутствие (В) активатора фермента - ионов марганца (активность выражена в нмоль/ч на 1 мг белка, в скобках - в % к скорости гидролиза карнозина)

Субстрат	10 мМ, А		1 мМ, Б		1 мМ, В	
Карнозин	31,613,2	(100%)	3,7 1 0,5	(100%)	6,3 1 0,5	(100%)
Анзерин	8,1612,5	(25,8%)	0,810,15	(21,6%)	1,310,3	(20,6%)
Офидин	5.32 1 2,0	(16,8%)	0,8 1 0,30	(21,6%)	0,7 1 0,2	(11,1%)
Гомокарнозин	0,05	0	0,2	(5,4%)	0.2	(3,2%)
Карцинин	0,1	0	0	0	0	0
N- Ацетилкарнозин	0,01	0	0	0	0	0

Рис. 1. УФ-Спектры первичных продуктов ПОЛ, образованных при индукции ПОЛ в мембранах саркоплазматического ретикулума лягушки на разных стадиях эксперимента в среде с 25 мМ контрольным рН-буфером (а) и в присутствии 25 мМ карнозина (б) [4]. Время индукции - 1 (1), 3 (2), 6 (3) и 20 мин (4)

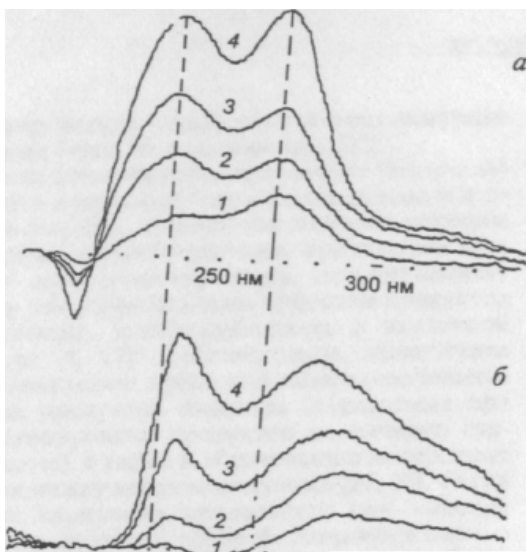


Рис. 2. Взаимодействие карнозина с активными формами кислорода: а - время жизни супероксид-аниона кислорода в отсутствие (1) и в присутствии 20 мкМ (2) и 2 мМ (3) карнозина (хотя количество супероксид-аниона, образуемого в каждом случае в результате импульсного радиолиза, одинаково, видно, что исходный уровень кривых понижается карнозином дозозависимым способом); б - снижение концентрации гидроксид-радикала индуцировали УФ-освещением раствора пероксида водорода; подробности эксперимента описаны ранее).

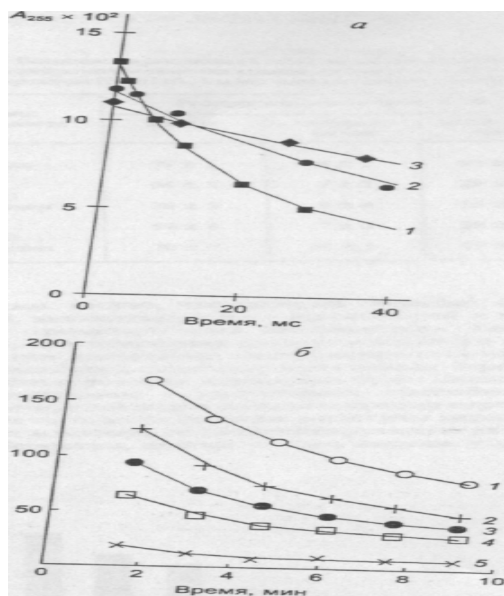


Рис. 3. Скорость аккумуляции кальция *a* - Активность Са-АТРазы (уатр. мкмоль Р/мин на 1 мг белка). *б* - Накопление МДА в мембранах саркоплазматического ретикулума лягушки (нмоль МДА на 2 мг белка), *в* - при индукции ПОЛ в присутствии ионов железа и аскорбата в среде с 25 мМ нейтральным рН-буфером (1) или карнозином (2).

