

# **КАРНОЗИН: БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ**

**Ключевые слова:** карнозин, биологическая роль, обзор.

В обзоре обсуждается биологическая роль гистидинсодержащего дипептида карнозина (β-аланил-L-гистидина). Представлены данные о свойствах карнозина и его возможной биологической роли в тканях позвоночных. Приводятся данные об антиоксидантных свойствах карнозина и родственных соединений. Автором сформулированы представления о мембранопротекторной функции карнозина, которая выявляется при его действии на клетки, ткани, а также организм в целом, и описаны его свойства как антистрессорного, радиопротекторного фактора. Представленные данные позволяют заключить, что карнозин является перспективным иммуномодулирующим средством для использования в медицине.

Карнозин, обнаруженный впервые В. Гулевичем и С. Амрадзидзи в 1900 г., до сих пор привлекает к себе внимание исследователей как неразгаданная тайна природы. Природный карнозин экстрагируется из мышц крупного рогатого скота и может быть получен как побочный продукт при производстве АТФ. Один из наиболее используемых способов химического синтеза карнозина - это конденсация при низкой температуре фталоил-β-аланилхлорида с L-гистидином в присутствии триэтиламина, что приводит к синтезу фталоил-β-аланилгистидина. При удалении фталоильной группировки гидразином образуется карнозин. В настоящее время описано получение целого семейства сходных по структуре гистидиновых дипептидов.

В литературе предложено несколько способов разделения и определения гистидина, карнозина и анзерина с использованием метода тонкослойной хроматографии и жидкостной хроматографии высокого давления, позволяющей определять следовые количества карнозина и его производных.

Гистидинсодержащие дипептиды являются специфическими компонентами скелетной мускулатуры. В некоторых случаях мышечные ткани содержат только один дипептид, например, в мышцах лягушки встречается только карнозин, а анзерин — единственный дипептид, обнаруживаемый в мышцах форели. В то же время некоторые виды мышц не содержат ни одного дипептида, а в мышцах кролика присутствуют как карнозин, так и анзерин. В мышцах миноги в дополнение к дипептидам находят ощутимые количества их предшественников, β-аланина и гистидина. Дипептиды обнаруживаются также и в немышечных тканях, главным образом в мозге. Там же найдены гомокарнозин (дипептид, образованный из гистидина и γ-аминомасляной кислоты) и ацетилированные производные дипептидов.

Мышечные ткани беспозвоночных практически не содержат дипептидов, однако большое количество гистидина и β-аланина находят в мышечной и нервной тканях некоторых высокоорганизованных моллюсков.

Возникновение дипептидов связано с определенным этапом эволюции, что можно продемонстрировать на примере онтогенетического развития мышечной ткани различных животных. Так, для мышц уток и цыплят показано, что карнозин появляется в период, непосредственно предшествующий вылуплению. Одновременно с этим уменьшается содержание в мышечной ткани глутатиона, гистидина и β-аланина. Анзерин появляется в мышцах на более поздних стадиях развития, что совпадает с уменьшением количества карнозина. Функциональное значение этих перемен до настоящего времени неизвестно.

## **МЕХАНИЗМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГИСТИДИНОВЫХ ДИПЕПТИДОВ**

Существует несколько теорий, объясняющих биологическое действие карнозина, анзерина и их производных. Во-первых, эти соединения обладают высокой буферной емкостью и их можно рассматривать как природные рН-буферы. Во-

вторых, они являются участниками важных метаболических превращений в тканях. Наконец, в-третьих, они способны проявлять существенную антиоксидантную активность, предотвращая разрушение клеток и тканей свободными радикалами. Достоинства каждой из этих теорий будут оценены ниже.

**Цитозольные буферы рН.** Активная мышечная работа сопровождается стимуляцией гликолиза и образованием молочной кислоты, что должно приводить к понижению рН. Интересен тот факт, что добавление карнозина к омывающему утомленную мышцу раствору приводит к восстановлению мышечного сокращения, при этом генерация единичного потенциала действия не подвергается изменению. В некоторых нейронах истощение карнозина приводит к трансформации ритма в передаче серии потенциалов возбуждения через нервно-мышечные контакты утомленных мышц. Более того, карнозин увеличивает частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки, что соответствует усилению спонтанного выхода медиатора в синаптическую щель. Тем не менее этот эффект не способствует увеличению квантового выхода ацетилхолина при его синхронном выходе во время формирования сократительного ответа нейромышечных препаратов. Важно заметить, что добавление карнозина в омывающий раствор не приводит к увеличению концентрации этого дипептида в миоплазме.

Аккумуляция карнозина внутри мышц обнаруживается только после периода активной мышечной работы и не проявляется при выдерживании мышцы в физиологическом растворе, содержащем карнозин. Показано также, что реактивация утомленной мышцы может быть обеспечена добавлением в окружающую среду трис-буфера в анаэробных условиях. По мнению В. П. Скулачева, карнозин (рК 6,8) и в еще большей степени анзерин (рК 7,04) выполняют существенную функцию стабилизации внутриклеточного рН и подвижного переносчика протонов.

**Участие в промежуточных метаболических путях.** Гистидиновые дипептиды аккумулируют метаболически важные продукты, образующиеся в результате деградации нуклеиновых кислот и нуклеотидных коферментов. Это особенно важно для мышц, так как участвующие в гидролизе дипептидов специфические ферменты присутствуют не в мышцах, а в других видах тканей, таких как печень и почки. Изучение метаболизма карнозина в печени было проведено недавно и показало, что ответственный за его гидролиз фермент карнозиназа расположен в цитоплазматической области клеток. Также недавно стало известно об активности этого фермента в плазме крови больных с алкогольной хронической миопатией.

Изучены некоторые свойства цитоплазматической карнозиназы и установлено, что фермент ингибируется бестатином. В последнее время синтезированы аналоги карнозина, оказывающие ингибирующее влияние на активность карнозин-синтетазы. Использование ингибиторов карнозиназы и карнозин-синтетазы может быть весьма полезным для выяснения связи метаболизма дипептидов с метаболизмом клеток и тканей.

**Антиоксидантные свойства.** Карнозин известен как антиоксидант, который способен предотвращать накопление окисленных продуктов, появляющихся в ходе перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран. Это особенно интересно, так как карнозин является водорастворимым веществом и не акцептируется теми мембранными структурами, которые подвержены процессу перекисления. Однако, как отмечалось ранее, и карнозин, и анзерин усиливают эффект жирорастворимых антиоксидантов, таких, например, как  $\alpha$ -токоферол. Позднее было найдено, что карнозин обладает супероксиддисмутазной активностью и является регулятором активности липоксигеназы (Ланкин, Стволинский и Болдырев, неопубликованные данные).

Детальное исследование кинетики перекисного окисления липидов в мембранах саркоплазматического ретикулума показало, что способность карнозина ингибировать накопление продуктов ПОЛ определяется не только взаимодействием дипептида со свободными радикалами, но также и с первичными молекулярными продуктами перекисного окисления липидов. Позднее разными авторами было подтверждено свойство

карнозина и аналогичных соединений предотвращать развитие ПОЛ.

В табл. 1 приведены данные об антиоксидантной активности гистидиновых дипептидов в модельных системах, включающих мультиламеллярные липосомы из соевого фосфатидилхолина в присутствии водорастворимого инициатора радикального процесса 2,2-азобис(2-аминопропан)-дигидрохлорида.

Таблица 1. Антиоксидантная активность гистидинсодержащих соединений, оцениваемая по способности защищать от окисления мембранные липиды

Соединение	Скорость окисления, мкмоль/мин	Ингибирование, %
Контроль	3,6	0
$\beta$ -Аланил-L-гистидин (карнозин)	1.7	53
$\alpha$ -Аланил-L-гистидин	2.2	39
$\alpha$ -Аланин	3.6	0
$\beta$ -Аланин	3.6	0
$\alpha$ -Аланил-L-аланин	3.6	0
$\beta$ -Аланил-L-аланин	3.6	0
Гистидин	2.1	42
Гистамин	2.6	28
Анзерин(нитрат)	1.3	60
Гомокарнозин	1,6	56
3-Метил-L-гистидин ( $\tau$ )	1.6	56
1-Метил-L-гистидин ( $\pi$ )	2.2	36
$\gamma$ -Аминомасляная кислота	3.6	0
1-Метилимидазол	3.4	6
4(5)-Метилимидазол	1.8	50
2-Метилимидазол	2.6	28
NaNO <sub>3</sub> ,	3.6	0

Эта система способствует образованию гидроперекисных продуктов фосфолипидов. Из таблицы видно, что изомер карнозина  $\alpha$ -аланил-L-гистидин, который чрезвычайно близок по структуре к карнозину, обладает более низкой, чем карнозин, антиоксидантной активностью. Более того, аланиновые дипептиды в обеих комбинациях ( $\alpha$ -аланил-L-аланин или  $\beta$ -аланил-L-аланин), а также  $\gamma$ -аминомасляная кислота, входящая в состав гомокарнозина, антиоксидантной активностью не обладают.

Заслуживает внимания, что гистидиновая часть карнозина является эффективным тушителем пероксильных радикалов. Гистамин, который не содержит карбоксильной группы, является слабым тушителем пероксильных радикалов. Результаты, полученные для других производных гистидина, дают основание предположить, что имидазольное кольцо является ответственным за антиоксидантную активность. Имидазол и 4(5)-метилимидазол также являются активными антиоксидантами и демонстрируют заметное уменьшение скорости перекисления фосфолипидов. Метилирование первого или третьего атомов азота имидазольного кольца, как в 1( $\pi$ )-метил-L-гистидине(анзерин) или 4( $\tau$ )-метил-L-гистидине(офидин), сохраняет антиоксидантные свойства, тогда как 1-N-метилимидазол имеет низкую активность. Этот вывод недавно подтвержден в независимых экспериментах, где показана способность имидазола и его производных

взаимодействовать с синглетным кислородом.

Все имидазольные соединения, обладающие антиоксидантной активностью, являются также электрохимически активными. Карнозин ингибирует окислительное гидроксילирование дезоксигуанозина, индуцированное аскорбиновой кислотой и ионами меди. Соответствующая способность некоторых биологических антиоксидантов — производных имидазола блокировать окисление 2,5-бис- (гидрокси метил)фурана в системе, содержащей в качестве фотосенсибилизатора бенгальский розовый и поверхностно-активный сенсibilизатор, образующие чистый синглетный кислород, показана недавно. Авторами получены значения кажущейся константы первого порядка для реакции окисления в присутствии различных гистидинсодержащих дипептидов и их производных (табл. 2).

*Таблица 2. Константы скорости псевдопервого порядка для окисления 2.5-бис-(гидрокси метил)фурана синглетным кислородом в присутствии гистидина и родственных ему соединений.*

Соединение	Относительные константы скорости
Контроль	1.00
1 мМ карнозин	0.76
1 мМ азид	0.72
1 мМ гистидин	0.94
2 мМ гистидин	0.82
3 мМ гистидин	0.73
5 мМ гистидин	0.58
1 мМ гистидил-β-аланин	0.77
3 мМ гистидил- β -аланин	0.61
5 мМ β -аланин	0.82
1 мМ гомокарнозин	1.03
3 мМ гомокарнозин	0.73
1 мМ эрготионеин	1.12
1 мМ тиогистидин	1.13
1 мМ мочевины	1.00
2 мМ гистидин + 2 мМ β-аланин	0.80
3 мМ гистидин + 3 мМ β-аланин	0.73
5 мМ гистидин + 5 мМ β-аланин	0.61
1 мМ гистидин + 1 мМ γ-аминомасляная кислота	1.00
1 мМ гистидин + 3 мМ γ-аминомасляная кислота	0.80

Из таблицы видно, что гистидин наименее активен в реакциях окисления. Карнозин защищает субстраты от окисления в степени, средней между гистидином и азидом натрия — известным тушителем синглетного кислорода. В то же время эрготионеин, тиогистидин и мочевины (1 мМ) не обладают антиоксидантной активностью. Гомокарнозин в концентрации 1 мМ (в противоположность предыдущей модели — см. табл. 1) не является защитным агентом для субстратов при окислении синглетным кислородом. Однако в большей концентрации (3 мМ) гомокарнозин защищает субстраты так же эффективно, как и гистидин. Эквимолярная смесь L-гистидина и L-аланина ведет себя так же, как и гистидин или смесь L-гистидина и β-аланина. β-аланин способен защищать субстраты от

окисления только в очень незначительной степени.

**Другие теории биологического действия.** Карнозин и анзерин являются эффективными хелатирующими агентами для переходных металлов. Предполагается, что карнозин может участвовать в реакциях, связанных с превращениями меди *in vivo*. Показано, что карнозин имеет центр связывания на альбумине, хотя не показано значение такой ассоциации.

Другая возможная роль карнозина и анзерина заключается в их действии как нейротрансмиттеров в обонятельных луковицах и как регуляторов некоторых ферментов. Карнозин, например, активирует некоторые ферменты гликолиза, такие как фосфоорилаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), которая катализирует центральную реакцию гликолиза. Гистидин обладает подобной же способностью активировать ГАФД, но ни гистидин, ни карнозин не активны в присутствии ЭДТА — комплексона, который связывает ионы тяжелых металлов в инкубационной среде.

## **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ГИСТИДИНОВЫХ ДИПЕПТИДОВ**

Эффект карнозина и его производных на сократимость утомленных мышц является первым примером их физиологической важности. Другие эффекты карнозина заключаются в способности уменьшать артериальное давление, нормализовать дыхание и индуцировать сон, снижать гиперактивность. Карнозин обладает также свойствами адаптогенных препаратов. Эксперименты, проведенные на крысах, показали, что введение карнозина (2—20 мг на 1 кг веса) действует как противовоспалительное и антистрессорное средство. Было определено, что в дозах до 500 мг на 1 кг веса карнозин и анзерин не являются токсичными. Позднейшие оценки (для мышей, при оральном введении) дали значение LD<sub>50</sub>, равное 15 г на 1 кг веса.

Многие физиологические эффекты карнозина и сходных соединений могут реализовываться на основе их антиоксидантных свойств. Большинство из этих веществ являются стабилизаторами мембран, что способствует защите мембранных липидов от окисления и сохранению функционирования мембран. Клеточные мембраны в значительной степени состоят из полиненасыщенных жирнокислотных компонентов и являются местом образования свободных радикалов. Перекисное окисление липидных (ПОЛ) компонентов ведет к реорганизации бислоевой структуры, нарушению межбелковых контактов и барьерной функции мембран. Другие эффекты ПОЛ включают ингибирование мембранных ферментов, например ионных насосов, которые перестают поддерживать ионные градиенты.  $\alpha$ -Токоферол, который в основном содержится в таких органах, как печень и сердце, является мощным защитным агентом от процесса перекисного окисления в этих тканях, но в скелетных мышцах его концентрация очень мала. Исследования *in vivo* показали, что карнозин и анзерин способны предохранять клеточные мембраны, поврежденные в процессе ПОЛ. Для карнозина также найдено, что он способен защищать мембранные белки — Na/K-АТФазу и Ca-насос. В последнем случае было обнаружено, что карнозин не только препятствует развитию процесса ПОЛ, но также защищает Ca-насос от действия токсичных продуктов, образующихся и процессе окисления липидов.

Было обнаружено, что карнозин входит в число водорастворимых антиоксидантов внутриглазной жидкости. Ткани глаза характеризуются достаточно высоким содержанием глутатиона, который обеспечивает там антиоксидантную функцию. При заболеваниях глаза, сопровождающихся активацией перекисных процессов, наблюдается уменьшение уровня глутатиона в хрусталике глаза. В процессе развития катаракты в глазу человека содержание как глутатиона, так и карнозина уменьшается в 7—10 раз. В экспериментах с хрусталиками глаза кролика нами было показано, что инкубация в течение 1 ч в присутствии карнозина обеспечивает вход

карнозина внутрь хрусталика. Карнозин также поддерживал уровень глутатиона при содержании хрусталика глаза в среде, содержащей карнозин в соответствующих концентрациях.

В специальной серии экспериментов был определен эффект карнозина при лечении глаз собак с выраженной сенильной катарактой. Этот эффект проявлялся как прояснение хрусталика глаза с изменением цвета от молочно-белого до серо-голубого, что свидетельствовало об уменьшении рассеивания света помутневшими частями хрусталика глаза, а также о восстановлении прозрачности кортекса. В экспериментах на хрусталике глаза кролика карнозин также способствовал уменьшению внутриглазного давления [36]. Эти эффекты дают основание для использования карнозина в терапии и профилактике глазных заболеваний.

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАРНОЗИНА

Разнообразие терапевтических эффектов карнозина и других гистидин-содержащих дипептидов дает основание для их использования.

Одним из следствий способности карнозина хелатировать переходные металлы может быть его участие в транспорте таких элементов в организме. Было показано, например, что карнозин и анзерин способны удалять ионы меди из центров ее связывания на альбумине и регулировать транспорт меди через мембраны клеточных органелл. Нарушения в метаболизме меди могут приводить к особым патологическим состояниям, например к болезни Вильсона.

Одной из главных задач современной физико-химической биологии является изучение роли свободных радикалов при различных патологических состояниях живого организма. Синдром, вызванный нарушениями, производимыми свободными радикалами, может быть предотвращен при введении экзогенных соединений, способных защищать организм от свободных радикалов. Известны многие синтетические и некоторые природные соединения, способные защищать клетки и ткани от процесса ПОЛ, вызывающего различные болезни.

Однако широкое использование синтетических антиоксидантов лимитируется присущими им побочными эффектами. В то же время некоторые природные антиоксиданты, присутствующие в необычно больших концентрациях, способны менять метаболизм в патологических условиях. Природные гистидинсодержащие дипептиды — карнозин и анзерин — обладают выраженными антиоксидантными свойствами. Они способны защищать от повреждения мембраны и другие клеточные структуры. Кроме того, дипептиды метаболизируют с образованием продуктов, имеющих важное метаболическое значение. Так,  $\beta$ -аланин стимулирует синтез коллагена [33], а гистидин включается в синтез белков и нейромодуляторов.

Как отмечалось ранее, карнозин способен ингибировать перекисное окисление, индуцированное и энзиматическим, и неэнзиматическим путем, а также элиминировать продукты свободнорадикальных процессов. Эти эффекты не являются тканеспецифическими и связаны со стабилизацией мембран, сохранением и восстановлением структуры мембран интактных клеток.

Разнообразные свойства карнозина стали причиной для исследования его терапевтического действия, которое было начато в нашей стране в 30-х годах. До сих пор карнозин не был широко использован в связи с отсутствием знаний о механизме его действия и оснований для его широкого использования в качестве лекарственного средства. Однако мы видим, что карнозин дает многообещающие результаты при лечении гипертонических заболеваний, язвы желудка, полиартритов и других патологий.

Обобщая приведенные выше данные, можно предположить, что неэнзиматическая антиоксидантная активность карнозина должна способствовать заживлению

поверхностных ран или разрывов микрофиламентов мышц и улучшать сохранность вакцин и сывороток, тканевых и клеточных структур. Карнозин может найти широкое применение как природный нетоксичный антиоксидант в лабораторных экспериментах с клеточными модельными системами или клеточными органеллами (фракциями). Нативность таких фракций может быть стабилизирована карнозином за счет протонсвязывающих свойств, а также за счет тушения свободных радикалов.

Можно предположить, что в процессе лечения таких заболеваний, как ВИЧ (СПИД), и поверхностных ран, которые развиваются вследствие уменьшения иммунной реакции, применение карнозина может оказать положительный эффект в сочетании с химио-и радиотерапией. Недавно было продемонстрировано эффективное использование карнозина для лечения рака.