

ОТКРЫТИЕ КАРНОЗИНА И РОДСТВЕННЫХ ЕМУ СОЕДИНЕНИЙ

Открытие карнозина и установление его структуры. В начале XX в. В.С. Гулевич, исследуя экстрактивный состав мясного фарша, обратил внимание на то, что общее содержание азота в пробах существенно превышает белковый азот и азот известных в то время экстрактивных соединений мышечной ткани. Это обстоятельство позволило ему предсказать возможность существования в мышцах еще не известных азотистых соединений, а затем и выделить их из мышечного экстракта.

Первое из соединений этого ряда было выделено из водной суспензии мясного фарша при ее обработке фосфорно-вольфрамовой кислотой. Полученный при этом объемный осадок отделяли и добавляли к нему на холоду едкий барий; фильтрат нейтрализовали азотной кислотой и обрабатывали азотнокислым серебром. Осадок разлагали сероводородом, а затем из горячего маточного раствора осаждали спиртом в виде азотнокислой соли. Соль кристаллизовалась в звездообразные друзы в виде игольчатых кристаллов. Высушенные кристаллы легко растворялись в воде.

Полученное свободное основание соответствовало формуле $C_{14}H_{14}N_4O_3$ было легко растворимо в воде, имело щелочную реакцию и высаживалось из воды спиртом в виде мелких игольчатых кристаллов. Вещество плавилось с разложением при $239\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поскольку соединение было обнаружено в мясном фарше, оно получило название карнозин (от латинского «caro»: carnis — мясо) (Gulewitsch, Amiradgibi, 1900). Опубликовав предварительное сообщение о новом экстрактивном веществе из мышечной ткани, В.С. Гулевич приступил к систематическому изучению его свойств. Химик по образованию, Гулевич любил аналитическую работу и много времени проводил в лаборатории. В ходе исследования он обнаружил, что целый ряд физико-химических свойств серебряной и азотнокислой солей карнозина были сходны со свойствами солей аргинина. Гулевич предпринял попытку найти аргинин в составе карнозина, однако щелочной гидролиз карнозина приводит к образованию гистидина (а не аргинина) и соединения с формулой $C_3H_7NO_2$, которое могло быть аланином. На основании этих данных Гулевич предположил, что карнозин может иметь белковую природу: этот природный дипептид, производный гистидина (гистидил-аланин или аланил-гистидин) мог образоваться из низкомолекулярных пептидов в результате декарбоксилирования аргинина (Gulewitsch, 1907a).

Тем временем из других лабораторий, занятых аналогичными исследованиями, также стали поступать данные об экстрактивных соединениях мышечной ткани. В дополнение к карнитину и метилгуанидину, также открытым В.С. Гулевичем, Ф. Кучер (Kutscher, 1905) сообщил об открытии игнотина. Исходя из расчетов содержания в мышечной ткани общего азота и известных азотистых соединений, Гулевич предполагал, что это соединение идентично карнозину. Однако, поскольку для выделения игнотина Кучер использовал другие приемы (в частности, для осаждения продукта применялся таннин), высказывалась мысль, что эти соединения различны. Гулевич просит у Кучера образец игнотина и получив 1г препарата, сравнивает оба соединения. И хотя сравнение показывает идентичность веществ (Gulewitsch, 1906), Кучер возражает. Он вынуждает Гулевича еще и еще раз возвращаться к этому вопросу. Возникает полемика, которая длится без малого 2 года. Завершая ее в 1907 г., Гулевич пишет: «Таким образом, после данного мною детального описания отношения карнозина к азотнокислому серебру и аммиаку при различных условиях, я надеюсь, что и для Кучера этот вопрос будет достаточно ясным. В противном случае я хотел бы ему посоветовать в дальнейшей дискуссии оставить путь априорных умозаключений, а вступить, правда, на более трудный, путь собственных экспериментальных исследований, который только и ведет к вскрытию действительного положения вещей» (Gulewitsch, 1907b). Из этого эпизода видно отношение В.С. Гулевича к научной истине. Его жизнь в науке — это биография

педантичного исследователя, для которого установление непреложных научных фактов является важнейшей целью.

В.С. Гулевич приступает к уточнению структуры карнозина (Gulewitsch, 1911). Сюрпризом стало то, что, судя по реакции вещества $C_3H_7NO_2$ с α -нафтилизотиоцианатом, оно оказалось не α -аланином. По растворимости и свойствам солей нафтилизотиоцианатных производных выделенное вещество было идентифицировано как β -аланин. Вместе с И.А. Смородинцевым Гулевич начинает работу по установлению порядка взаимодействия аминокислот в молекуле карнозина. Однако обстоятельства не благоприятствуют этому: начинается первая мировая война. Несколько лет спустя этот вопрос был решен методом химического синтеза, и карнозин был идентифицирован как β -аланил-гистидин (Baumann, Ungwaldsen, 1918).

Исследование показало, что карнозин с помощью препаративных методов не обнаруживается в печени, селезенке, легких, почках, крови, моче и молоке млекопитающих (Гулевич, 1926). Результаты подтверждали точку зрения В.С. Гулевича, определявшего карнозин как специфическое (по крайней мере, у млекопитающих) вещество мышечной ткани. Поэтому в различных лабораториях были сделаны попытки найти экспериментальные доказательства связи между карнозином и функциями мышечной ткани.

В ходе экспериментов было установлено, что, хотя карнозин относительно легко распадается на составные части при щелочном или кислотном гидролизе, протеолитические ферменты (пепсин, трипсин) на него не влияют. Не способна гидролизовать карнозин и кишечная флора, а в присутствии кишечного сока происходит лишь медленное расщепление его на гистидин и β -аланин. Фермент, обеспечивающий эту реакцию, был позже выделен и назван карнозиной (Hanson, Smith, 1949). Подкожное введение карнозина вызывало лейкопению, повышало сократимость кишечника и матки, а внутривенное — понижало кровяное давление. Введение карнозина в желудочно-кишечный тракт собак стимулировало продукцию желудочного сока и сонливость (Krimberg, 1925, 1926; Razenkow et al., 1927; Severin, 1939). Все это подтверждало точку зрения о наличии у карнозина специфических биологических функций. Таким образом, систематические исследования В.С. Гулевича и его сотрудников позволили описать первые биологические эффекты карнозина. Для решения этой проблемы следовало выяснить пути метаболизма карнозина, его связь со скелетной мускулатурой, а также описать физиологическую активность.

Химические свойства карнозина. Карнозин (β -аланил-L-гистидин) хорошо растворим в воде и довольно плохо — в спирте, обладает явно основными свойствами, может титроваться и как основание, и как кислота. Изoeлектрическая точка карнозина лежит при $pH\ 7,70 \pm 0,05$. Ионогенные группы, обеспечивающие его заряд, представлены имидазольным кольцом ($pK\ 6,96$) и аминогруппой β -аланина ($pK\ 9,24$). Карнозин оптически активен и имеет удельное вращение $[a]_D^{20} = +24,1\ ^\circ C$. Чистый препарат карнозина плавится с разложением при $246\ ^\circ C$. При нагревании с кислотами карнозин распадается на составные части. Перманганат бария окисляет его до CO_2 и NH_3 . Карнозин осаждается в виде солей целым рядом соединений; наиболее часто для этого применяют фосфорно-вольфрамовую и серную кислоты. Последняя более специфична, и получающийся комплекс карнозина мало растворим в воде (8,4 мг в 1 л). Фосфорилированные производные карнозина, полученные еще в 50-е годы, использовались для характеристики предполагаемого интермедиата фосфорилирования в дыхательной цепи (Северин, 1992).

История открытия анзерина. Довольно скоро стало понятно, что наличие карнозина в составе экстрактивных соединений скелетной мускулатуры не является случайным. Начатые вслед за открытием карнозина исследования его распространения у различных животных вскоре показали, что ткани некоторых птиц не содержат этого вещества (Clifford, 1921). Вероятно, данный факт повысил интерес исследователей к экстрактивным

веществам из мышц птиц, и в 1929 г. одновременно Толкачевская из мышц кур (Tolkatschewskaya, 1929) и Ackermann et al. (1929) из мышц гуся выделили близкое к карнозину органическое соединение, получившее название анзерин (видовое название гуся — *Anser anser*).

Вероятно, это вещество было впервые описано раньше. Еще в 1909 г. Suzuki с соавт., исследуя экстрактивные вещества некоторых рыб, выделили соединение, похожее на карнозин, но не идентичное ему по ряду свойств. В частности, оно не давало характерной для карнозина диазореакции и не осаждалось в виде серебряно-бариевой соли. Авторы пришли к выводу, что в составе мышц исследованных ими рыб содержится какой-то изомер карнозина. Скорее всего, речь шла об анзерине, который на самом деле является не изомером, а метилированным производным карнозина.

Влияние на внутриглазное давление. Введение карнозина под конъюнктиву глаза кролика (0,2 мл 10 мМ раствора) достоверно снижало внутриглазное давление, в то время как введение физиологического раствора вызывало кратковременную реактивную гипертензию, в патогенезе которой определенную роль играет выброс простагландинов (Ермакова и др., 1988). В прямых опытах с введением простагландина E2 в конъюнктивальный мешок показано, что, если во всех опытах внутриглазное давление повышалось на 5—16 мм рт. ст., то предварительное введение карнозина способствовало менее резкому подъему давления (через 45 мин разница составляла 3—4 мм рт. ст.). Воздействие карнозина на течение простагландиновой гипертензии может быть объяснено его возможным влиянием на проницаемость микрососудов глаза и способностью ограничивать местную воспалительную реакцию на введение простагландина или стабилизирующим влиянием на мембраны клеток целиарного эпителия. Эти опыты нуждаются в воспроизведении на других, более адекватных моделях, поскольку, как показывают эксперименты с витамином E, не всегда данные, полученные на животных, можно экстраполировать на человека: эффективному лечению витамином E поддается катаракта у животных, но не возрастные помутнения линзы глаза человека (Формазюк, Сергиенко, 1992).

Карнозин как пищевой консервант. Способность карнозина стабилизировать макромолекулы может быть использована при создании экологически приемлемых консервантов для продуктов питания (Decker, Crum, 1991), а также для улучшения сохранности вакцин, сывороток и клеточных культур. Этой цели служит его бактериостатический эффект (Cook, Tanaka, 1971).

Карнозин может найти широкое применение как природный нетоксичный антиоксидант в лабораторных экспериментах с культурами клеток, модельными системами или клеточными органеллами (фракциями).

Механизмы антиоксидантного действия карнозина. Эффекты карнозина реализуются не только за счет связывания продуктов реакции окисления, но и путем нейтрализации или взаимодействия с ее инициаторами — АФК. Первые косвенные подтверждения этого были получены в экспериментах по инициации ПОЛ различными АФК. Так, карнозин защищал генетический аппарат бактерий от повреждения, вызванного продукцией синглетного кислорода (Dahl et al., 1988), а в химической модели индукции окисления линолевой кислоты пероксильными радикалами — скорость ее окислительных превращений (Kohen et al., 1988). Позднее были получены и прямые подтверждения взаимодействия карнозина с основными известными АФК.

Особенно интересны опыты, характеризующие возможность взаимодействия карнозина с супероксид-анионом кислорода — первым АФК в цепи их взаимных превращений. При тех концентрациях супероксида, которые характерны для нормального состояния ткани, карнозин не взаимодействует с ним заметным образом (Aruoma et al., 1989, Tanigawa et al., 1990; Yoshikawa et al., 1993), однако повышение его уровня в тканях, в условиях окислительного стресса, может сделать это взаимодействие вероятным (Pavlov et al., 1993, Klebanov et al., 1997). Сравнение эффективности карнозина и ряда других тушителей супероксид-аниона показывает, что хотя карнозин гораздо менее эффективен, чем супероксиддисмутаза (СОД), но по эффективности сравним с витаминами E и C. Таким образом, для тех тканей, которые бедны СОД, аскорбатом и α -токоферолом, но для которых

существует повышенная опасность окислительного стресса (возбудимые клетки), карнозин может явиться реальной защитой от супероксид-аниона. Более того, его присутствие может обеспечить клеткам альтернативный способ защиты от супероксида вместо образования пероксида водорода, которое предусмотрено в случае действия СОД.

Наконец, кроме взаимодействия карнозина с различными АФК было обнаружено и его регулирующее действие на ферменты, функция которых так или иначе связана со свободнорадикальными соединениями. Так, было продемонстрировано подавление карнозином и родственными ему соединениями тирозингидроксилазы и миелопероксидазы. Последнее обстоятельство может быть важным для процессов ранозаживления, поскольку миелопероксидаза определяет формирование воспалительного очага и влияет на его длительность при повреждении тканей.

Таким образом, выявление антиоксидантной активности карнозина позволило сформировать новый взгляд на биологическую роль этого соединения и объясняло разнообразие его клеточных эффектов. В последние годы во многом благодаря исследованиям отечественных биохимиков стало ясно, что карнозин по праву может занять место в таблице IV-3 как представитель класса низкомолекулярных гидрофильных антиоксидантов прямого действия (Boldyrev, 1990).