Antioksidativna svojstva karnozina

Čalić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:444673

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Marina Čalić

Antioksidativna svojstva karnozina

Antioxidant properties of carnosine

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2019.

Sažetak:

Antioksidativna svojstva karnozina

Karnozin je dipeptidni protein građen od β-alanina i L-histidina. U tijelu se nalazi u skeletnim mišićima, mozgu, jetri, bubrezima i srcu. Karnozin posjeduje antioksidativna svojstva.

U ovom radu pobliže su opisani slobodni radikali, pojam oksidativnog stresa te mehanizami lipidne peroksidacije i oštećenja DNA molekula. Govori se o karnozinu, njegovom nastajanju i njegovim metaboličkim putovima. Detaljno su objašnjeni i potkrijepljeni primjerima istraživanja načini antioksidativnog djelovanja karnozina kao i njegova uloga u liječenju bolesti i „*anti-age*“ efektu.

Rad je podijeljen u sedam poglavlja, od kojih su prva tri posvećena oksidativnom stresu u općenitom smislu, a četvrto i peto fokusiraju se detaljno na karnozin i njegova antioksidativna djelovanja.

Ključne riječi: karnozin, antioksidativnost, ROS, oksidativni stres

Abstract:

Antioxidant properties of carnosine

Carnosine is a dipeptide protein constructed of β-alanine and L-histidine. In the body it is found in the skeletal muscles, the brain, the liver, the kidneys and the heart. Carnosine has antioxidant properties.

This paper closely describes free radicals, the notion of oxidative stress and mechanisms of lipid peroxidation and DNA molecule damage. The paper talks about carnosine, the way it is synthetized and what its metabolic pathways are. Detailed explanations show the antioxidant properties of carnosine as well as its roles in disease treatments and *"anti-aging"*, all of which are supported with examples of actual research.

The paper is divided into seven chapters, the first three of which are dedicated to oxidative stress in general terms, and the fourth and the fifth one focus on carnosine and its antioxidant effects.

Key words: carnosine, antioxidativity, ROS, oxidative stress

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Slobodni radikali i ROS 2
3. Oksidativni stres 5
   3.1. Lipidna peroksidacija 5
   3.2. DNA modifikacije 6
4. Karnozin 8
   4.1. Svojstva karnozina 8
   4.2. Biosinteza i metabolizam karnozina 9
5. Karnozin u ulozi antioksidansa 11
   5.1. Liječenje Dijabetesa 14
   5.2. Liječenje Parkinsonove bolesti 15
   5.3. „*Anti-aging*“ svojstva karnozina 16
6. Zaključak 18
7. Literatura 19

1. Uvod

Posljednje desetljeće obilježio je porast zanimacije za zdravim životom. Sve više ljudi informira se o zdravoj prehrani, toksičnim tvarima i korisnim suplementima. Tako se povećala svijest o štetnim utjecajima slobodnih radikala i o antioksidansima koje treba unositi u organizam da se njihova koncentracija smanji.

Karnozin je antioksidativni dipeptid koji se prirodno nalazi unutar tijela u poprečno-prugastim skeletnim mišićima, mozgu, i u manjim koncentracijama u jetri, bubregu i srcu. Djeluje antioksidativno tako što uklanja slobodne radikale iz tijela.

Slobodni radikali su vrlo reaktivne štetne tvari koje u svojoj strukturi imaju nesparene elektrone. Oni uzrokuju odumiranje stanica i starenje organizma. Slobodne radikale povezuje se s mnogim bolestima, od kojih su neke Parkinsonova i Alcheimerova bolest, dijabetes te neki oblici raka.

U ovom radu opisuju se mehanizmi nastajanja oksidativnog stresa i antioksidativnog djelovanja karnozina, te se proučavaju istraživanja o njegovoj ulozi u liječenju bolesti i „*anti-aging*“ efektima.

2. Slobodni radikali i ROS

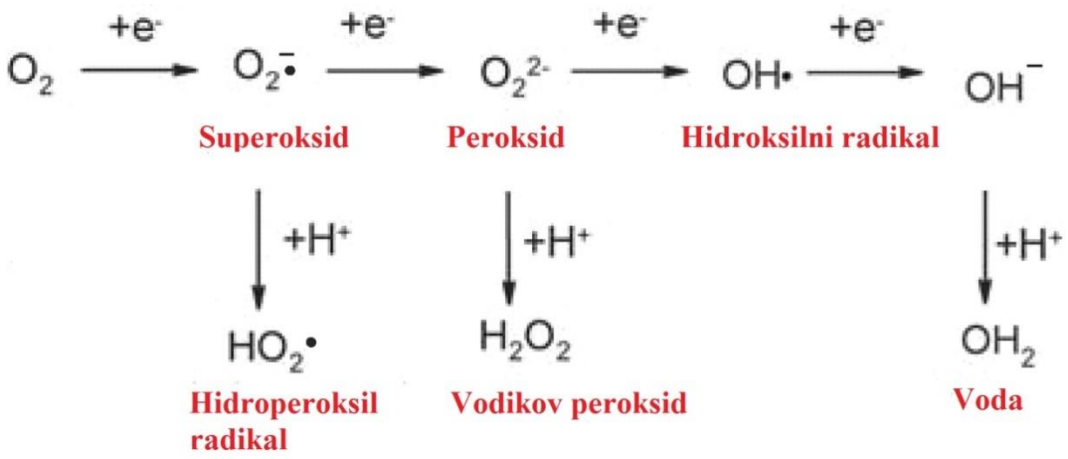
Slobodni radikali su kemijski spojevi koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Izrazito su reaktivni, ne mogu se izolirati niti detektirati jednostavnim metodama te imaju štetna djelovanja na organizam [1]. Mnogi spojevi mogu biti slobodni radikali, ali biološki su najznačajniji kisikovi i dušikovi. Ovaj rad opisuje isključivo kisikove slobodne radikale zbog njihove uske povezanosti s karnozinom. Kad se govori o kisikovim slobodnim radikalima, često se vodikov peroksid, singletni kisik i drugi svrstavaju zajedno s njima iz razloga što imaju slične posljedice za organizam. Svi ti kemijski spojevi tako su dobili zajednički naziv „reaktivni kisikovi spojevi“ (ROS) (tablica 1) [2].

Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi [2].

Reaktivni kisikovi spojevi, ROS			
Radikali		Ne-radikali	
$O_2^{\cdot -}$	Superoksid	H_2O_2	Vodikov peroksid
$^{\cdot}OH$	Hidroksil	$HOCl^-$	Hipoklorična kiselina
$RO_2^{\cdot}$	Peroksil	O_3	Ozon
$RO^{\cdot}$	Alkoksil	$^1O_2$	Singletni kisik
$HO_2^{\cdot}$	hidroperoksil		

Molekula kisika u svom osnovnom stanju ima paran broj elektrona, ali samo je deset valentnih elektrona spareno. Preostala dva imaju isti spin što takvu molekulu kisika čini diradikalom [1]. Međutim, O_2 se ne ponaša kao radikal. On je stabilan zato što posjeduje paralelne nesparene elektrone što znači da mu je za reakciju potreban spoj koji također sadrži nesparene elektrone istog spina. Većina atoma sadrži elektronske parove suprotnog spina što uvelike smanjuje reaktivnost molekulskog kisika [3]. Reaktivni kisikovi spojevi mogu nastati homolitičkim cijepanjem veza, reakcijama prijenosa energije, reakcijama molekula s drugim radikalom te oksidacijsko-redukcijskim reakcijama [3, 4]. Biološki su značajne reakcije prijenosa energije koje podrazumijevaju reakciju kisika sa spojem koji je apsorbirao svjetlosnu energiju i nalazi se u pobuđenom stanju. Takvi spojevi ponašaju se kao okidači za stvaranje singletnog kisika, a neki od njih su metilen plavo, eozin i druga organska bojila, riboflavin, bilirubin, retinal, ftalocijanini, itd. [5]. Oksidacijsko-

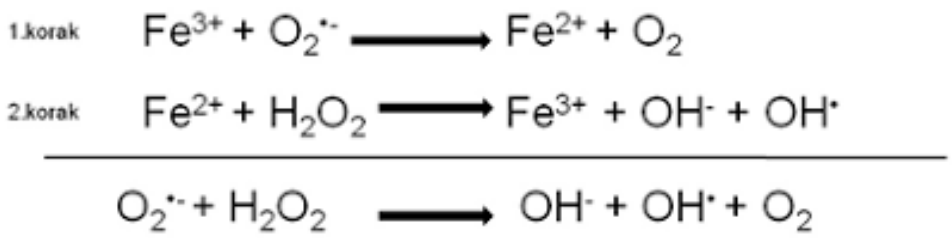
redukcijske reakcije glavni su izvor ROS-a u organizmu. Redukcijom kisika nastaje voda, a na slici ispod prikazani su svi koraci redukcije između kojih nastaju reaktivni međuprodukti (Slika 1.).



Slika 1. Redukcija kisika do vode.

Glavni izvor superoksida su mitohondriji. U njima se odvija posljednji korak staničnog disanja, transportni lanac elektrona, gdje se elektroni prenose među molekulama u nizu reakcija, stvarajući adenozin trifosfat (ATP). Kisik je posljednji u tom nizu elektron akceptora. Ubisemikinon, radikalski oblik ubikinona, reducira kisik i on se u 95-97% slučajeva reducira u potpunosti do vode. Međutim, u preostalih 3-5% oksidira se do superoksida [4]. On se ispušta u prostor unutarnje membrane mitohondrija te lako može proći kroz vanjsku membranu i dospjeti u citosol stanice. Još neki stanični izvori superoksida su leukociti i makrofagi. Osim staničnih, postoje izvori iz okoliša: insekticidi, toksične kemikalije, UV zračenje te enzimski izvori superoksida kao što je ksantin oksidaza [4]. Ksantin oksidaza katalizira pretvorbu hipoksantina u ksantin i ksantina u uričnu kiselinu, reakcije u kojima se kisik reducira te nastaju superoksid i vodikov peroksid [6]. Hidroksilni radikal ističe se po svojoj sposobnosti oksidiranja DNA molekula pri čemu se stvara opasnost od nastanka mutacija i kancerogenih stanica. Ima vrlo kratak životni vijek, svega 1 ns, što ga čini vrlo reaktivnim [3]. Štoviše, hidroksilni radikal je najjači oksidans od svih reaktivnih kisikovih spojeva i nije selektivan pri odabiru bioloških vrsta s kojima će reagirati, za razliku od ostalih ROS-a [4]. Najviše hidroksilnih radikala u organizmu nastaje reakcijom vodikovog peroksida s prijelaznim metalom koja pretvara vodikov peroksid u hidroksilni radikal i hidroksidni anion. U većini slučajeva je metal željezo te se ta specifična reakcija željeza s vodikovim peroksidom naziva Fentonova reakcija. Hidroksilni radikal u biološkim sustavima može nastati iz superoksida

kombinacijom dvije reakcije. Prvi korak je Haber-Weiss reakcija u kojoj superoksid reducira željezo, a slijedi ju Fentonova reakcija (Slika 2.). Superoksid i vodikov peroksid su jedini unutarnji izvori hidroksilnog radikala u organizmu [4].



Slika 2. Haber-Weiss (1. korak) i Fentonova (2. korak) reakcija [3].

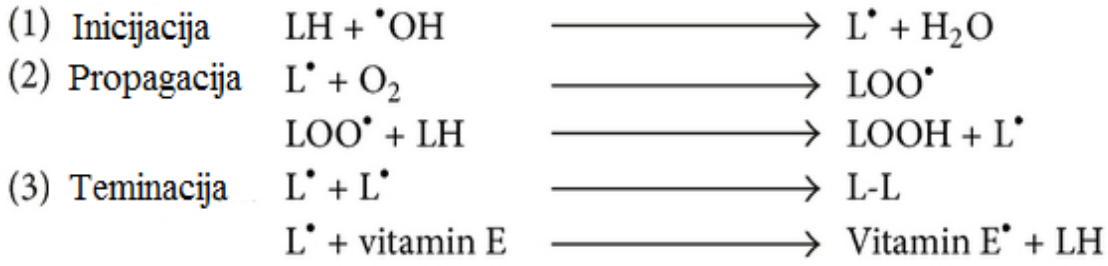
3. Oksidativni stres

Kisik je element neophodan za život čovjeka i drugih živućih organizama. Bez njega se ne može odvijati cijeli proces staničnog disanja. To je niz metaboličkih reakcija koje pretvaraju kemijsku energiju iz hrane koju čovjek unosi u molekule ATP-a, spremišta energije koja stanicama omogućuju obavljanje svih njihovih funkcija [7]. Stanično disanje je izrazito usklađeno, ali neprestano unošenje kisika i njegovo metaboliziranje nije bez greške. Tijekom mnogobrojnih metaboličkih procesa nastaju slobodni radikali i ROS. U normalnim uvjetima, oni se zatim izlučuju ili prevode natrag u spojeve sa sparenim elektronima pomoću enzima ili antioksidansa. Takve reakcije omogućuju održavanje ravnoteže u tijelu gdje nema prekomjerne količine slobodnih radikala i ROS-a. Međutim, njihovim prekomjernim nakupljanjem ravnoteža se pomiče i stvara se oksidativni stres [8]. Sažetu i preciznu definiciju oksidativnog stresa dao je Lushchak: „Oksidativni stres je situacija u kojoj je koncentracija ROS-a povećana, ometajući stanični metabolizam i njegovu regulaciju te oštećujući sastavne dijelove stanice.“ [9]. Stanje oksidativnog stresa uzrokuje odmatanje proteina, oštećenje masti, kolagena i DNA što za posljedicu ima apoptozu stanica (programirano odumiranje stanica kojim se kontrolira njihov broj [10]) te starenje organizma [8].

3.1. Lipidna peroksidacija

Biološke membrane koje sadrže polinezasićene masne kiseline u strukturi fosfolipida podložne su oksidativnom stresu, točnije lipidnoj peroksidaciji [4]. Hidrofobni repovi takvih fosfolipida sadrže reaktivne vodikove atome vezane na ugljik smješten između dvostrukih veza (kao struktura izolirane dvostruke veze diena). Kad u metabolizmu nastane oksidans poput hidroksilnog radikala ($HO^{\cdot}$), reakcijom istog s polinezasićenom masnom kiselinom u membrani nastaje lipidni radikal. To je prvi korak lipidne peroksidacije, inicijacijski korak. Zatim slijedi korak propagacije koji se događa brzo i u njemu lipidni radikal ulazi u reakciju s molekulom kisika dajući peroksilni lipidni radikal. Zbog svojih jakih oksidirajućih sposobnosti, peroksilni lipidni radikal može reagirati s novom molekulom polinezasićene masne kiseline gdje su produkti iste reakcije molekula hidroperoksida te još jedan lipidni radikal. Nastali lipidni hidroperoksid može reagirati s metalima pri čemu se stvaraju reaktivni i toksični aldehidni produkti, primjerice malondialdehid (MDA) i heksanal. No, lipidni hidroperoksid može se i reducirati antioksidansima ili glutation perokidazom (GPx), enzimom koji ga pretvara u slabo

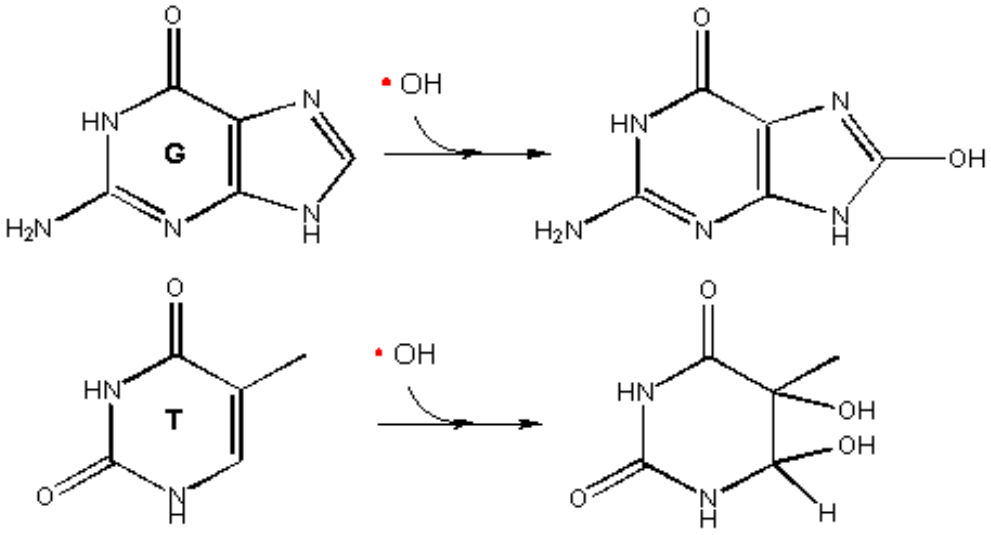
reaktivan alkohol. To je ujedno i posljednji, terminacijski korak lipidne peroksidacije. Osim enzimskom reakcijom, terminacijski korak može započeti i sudarom dva radikala (Slika 3.) [4, 11].



Slika 3. Lipidna peroksidacija [11].

3.2. DNA modifikacije

Slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja DNA moleukula. Glavnu ulogu ima $HO^{\cdot}$, kao i kod lipidne peroksidacije. On može reagirati s gotovo svim dijelovima DNA molekule: purinskim i pirimidinskim bazama te deoksiribozom [4]. Hidroksilni radikal je jak elektrofil i reagira s pirimidinskim bazama tako što se adira na C5 i C6 pozicijama te s purinskim bazama na C4, C5 te C8 pozicijama (Slika 4.) [3] .



Slika 4. Reakcija hidroksilnog radikala s bazama [12].

Gvanin je najpodložniji djelovanju hidroksilnog radikala, a jedan od produkata tog djelovanja je 8-okso-deoksigvanozin. On je najčešći predmet proučavanja štetnih djelovanja slobodnih radikala na DNA iz razloga što je prepoznatljiv i lako ga je analizirati u urinu. 8-okso-deoksigvanozin se u tijelu vrlo lako stvara, a njegova prisutnost je opasna

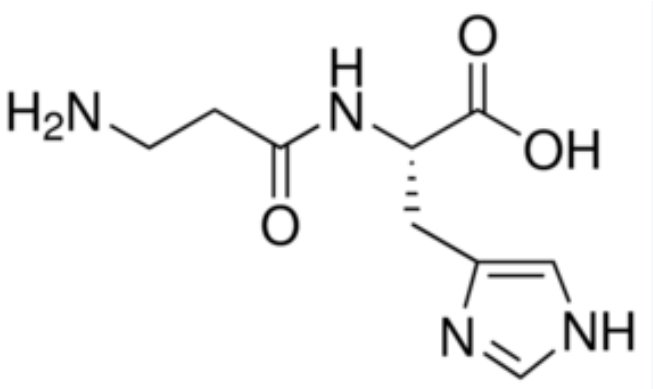
jer ima mutagena svojstva [4]. Gvanin nakon reakcije s hidroksilnim radikalnom gubi specifičnost pri sparivanju s bazama te se veže s adeninom i stvara greške u DNA lancu. Iako je replikacija DNA iznimno složen proces i gotovo bez greške zbog preciznih metoda njenih popravaka, velike količine hidroksilnih radikala stvaraju i više potencijalnih grešaka od kojih se neke neće ispraviti [3].

4. Karnozin

Karnozin (β-alanil-L-histidin, $C_9H_{14}N_4O_3$) je dipeptid građen od aminokiselina β-alanina i L-histidina. Prvi ga je otkrio ruski kemičar Vladimir S. Gulevich 1900. godine kada je izolirao nepoznati spoj iz mesa i nazvao ga karnozin (lat. *carnis* – meso). Strukturu karnozina otkrio je nakon što je alkalnom hidrolizom kompleksa karnozina sa srebrom uspio izolirati histidin, a kasnije je u strukturi otkrio i alanin [13, 14].

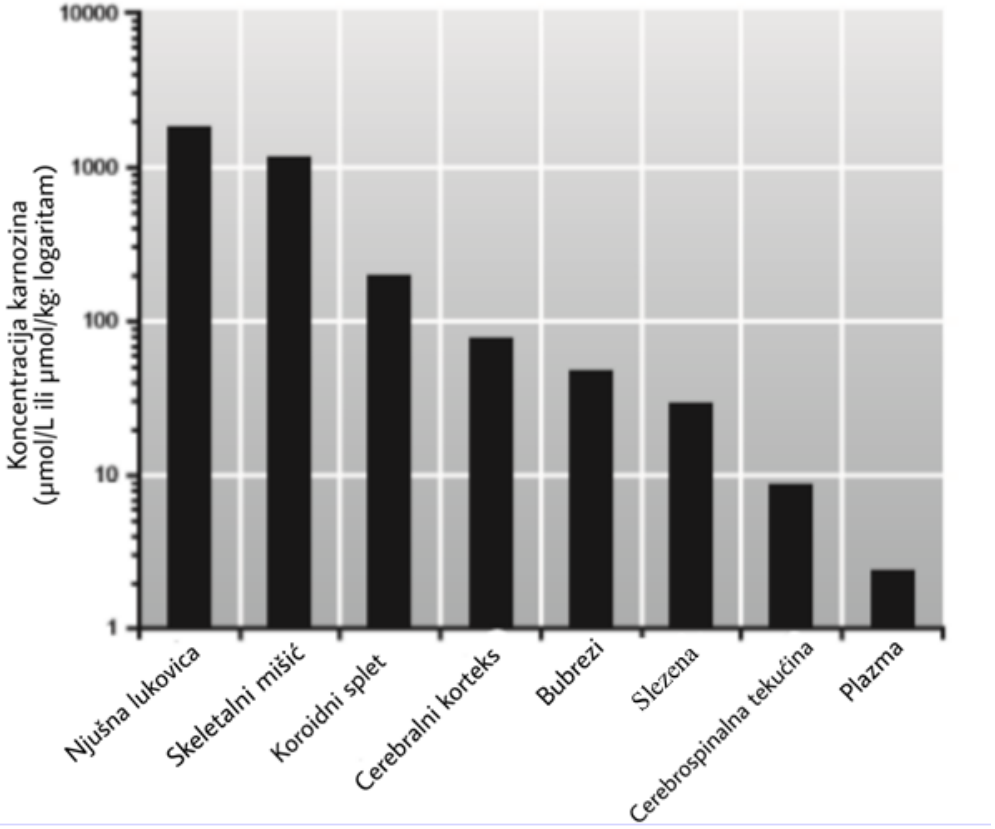
4.1. Svojstva karnozina

Karnozin je topljiv u vodi, pri sobnoj temperaturi je krutina, a talište mu je pri 253 °C (Slika 5.) [15]. Pri fiziološkoj pH vrijednosti (~7,4) nalazi se u obliku zwitter-iona iz razloga što su mu amino kraj β-alanina (pK_a = 9,32) te karboksilni kraj histidina (pK_a = 2,76) pri takvom pH ionizirani [13].



Slika 5. Struktura karnozina [13].

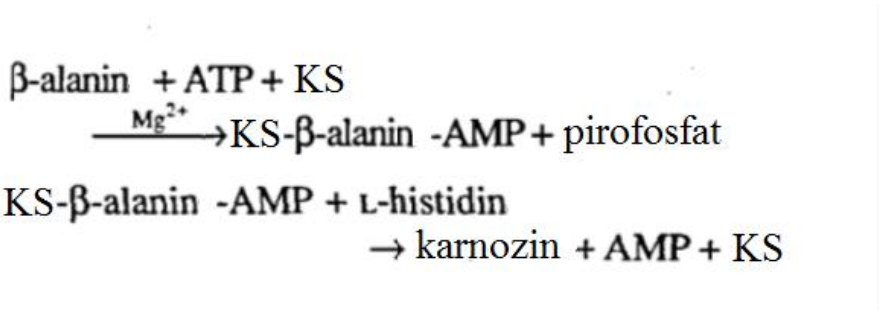
U tijelu životinja i čovjeka karnozin se u najvećim koncentracijama nalazi u poprečno-prugastim (skeletnim) mišićima i u mozgu, dok ga biljke uopće ne sadržavaju [16]. U mozgu je karnozin najkoncentriraniji u neuronima mirisnog režnja (Slika 6.).



Slika 6. Koncentracija karnozina u dijelovima tijela miševa; najviše karnozina nalazi se u mozgu i skeletnim mišićima [13].

4.2. Biosinteza i metabolizam karnozina

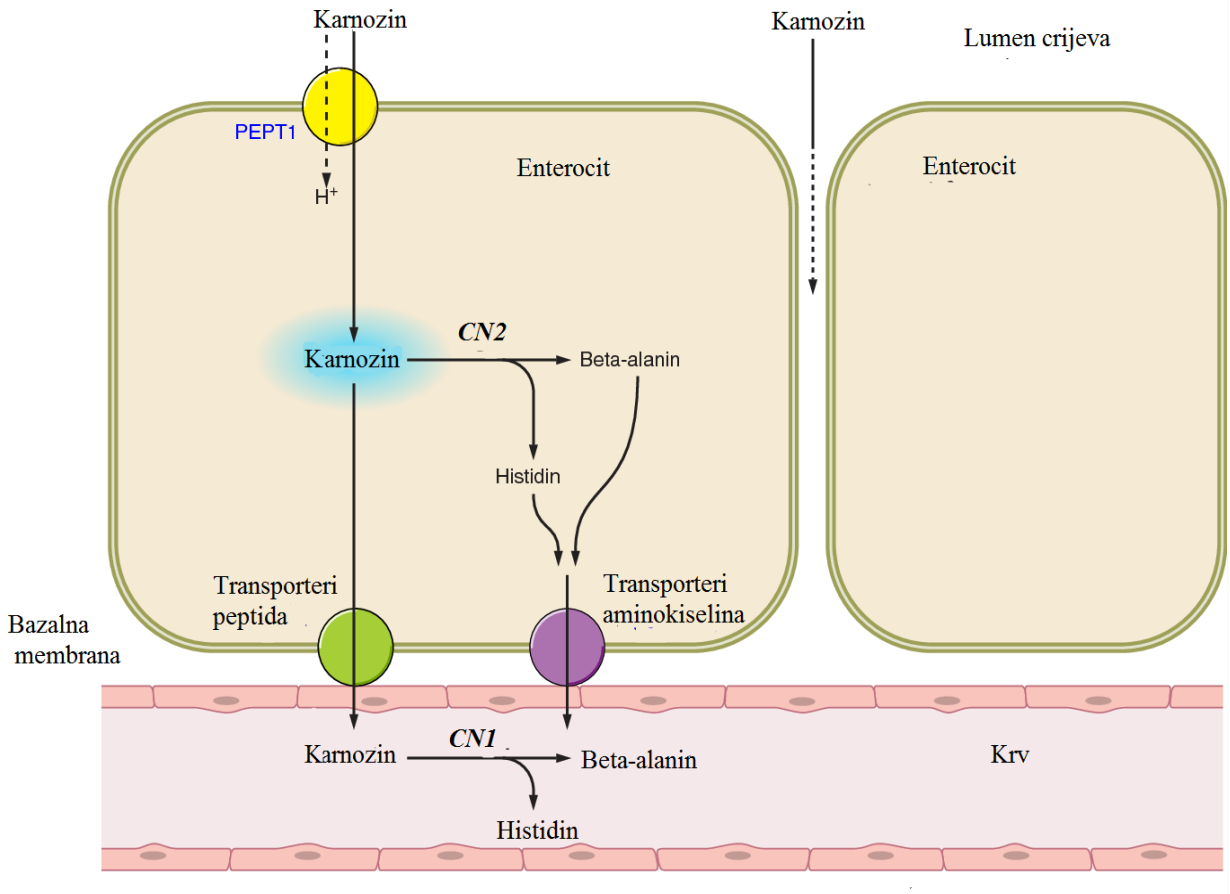
Karnozin se sintetizira reakcijom β-alanina i L-histidina uz pomoć karnozin sintetaze kao katalizatora. Za njegovo nastajanje potrebni su još magnezij i ATP (Slika 7.) [17].



Slika 7. Sinteza karnozina [17].

U tijelu se sintetizira u mišićnim stanicama i glija stanicama iz kojih putuje do neurona [13]. Karnozin unesen hranom apsorbira se u tankom crijevu i putuje krvlju do mišića, bubrega i jetre ili se hidrolizira odmah u stanicama tankog crijeva, enterocitima (Slika 8.).

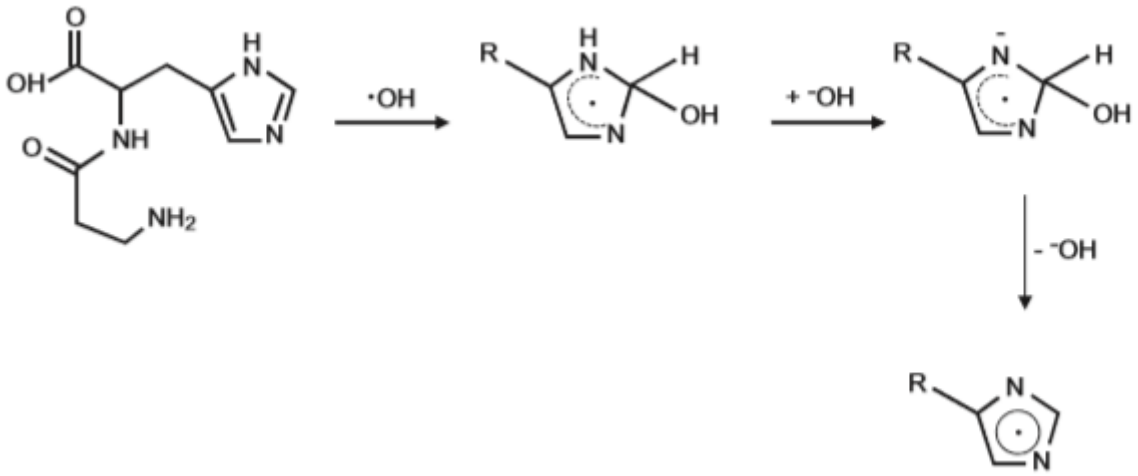
Kako bi prošao kroz staničnu membranu tankog crijeva i ušao u krvotok, potrebna mu je pomoć molekula transportera. To su oligopeptid transporter 1 (PEPT1) i 2 (PEPT2) te peptid/histidin transporter 1 (PHT1) i 2 (PHT2). PEPT1 transportira karnozin do krvi, a PEPT2 služi kako bi reapsorbirao karnozin akumuliran na različitim dijelovima tankog crijeva [10]. U tkivima se karnozin troši ako je potreban, a u suprotnom se hidrolizira na β-alanin i L-histidin uz pomoć karnozinaze, enzima specifičnog za hidrolizu karnozina i njemu srodnih spojeva. Karnozinaza se javlja u dva oblika: serumska karnozinaza (CN1) te citosolna nespecifična karnozinaza (CN2). Naposljetku se neiskorišteni višak karnozina izlučuje mokraćom [17].



Slika 8. Absorpcija i transport karnozina u krvotok [13].

5. Karnozin u ulozi antioksidansa

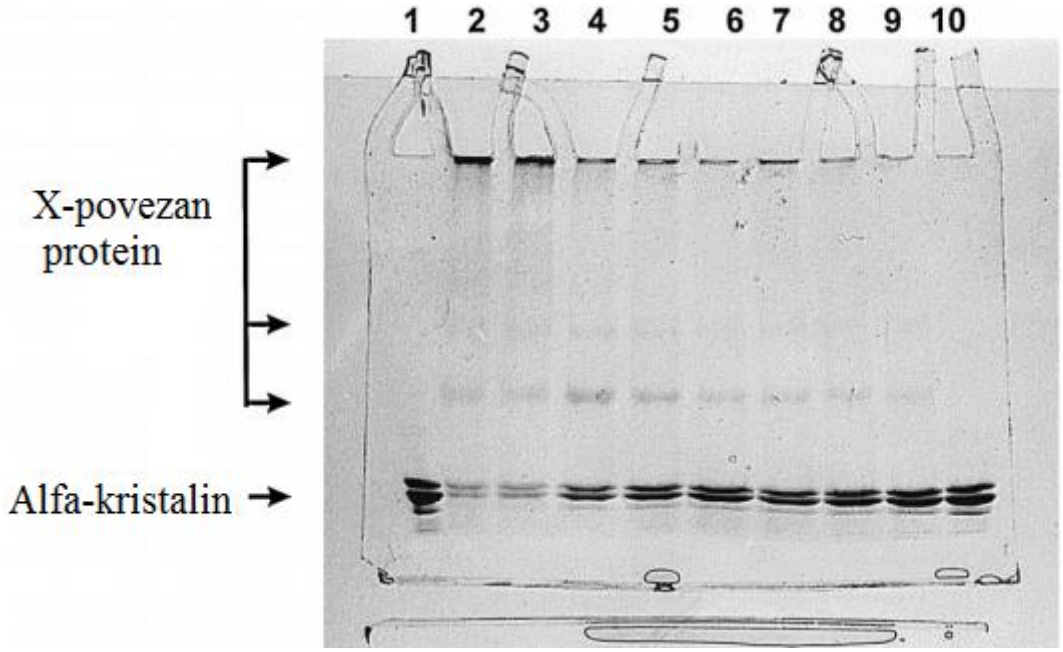
Postoji veliki broj istraživanja zbog kojih se može tvrditi da karnozin posjeduje korisna svojstva u obrani organizma od oksidativnog stresa [18-21]. Karnozin djeluje kao antioksidans sprječavajući negativne posljedice lipidne peroksidacije i drugih mehanizama oksidativnog stresa. Također, neka istraživanja pokazala su da se karnozin potencijalno može koristiti u liječenju dijabetesa i Parkinsonove bolesti [22-24]. Karnozin djeluje mehanizmima kelacije i uklanjanjem reaktivnih kisikovih jedinki te radikala kao što su peroksilni radikali. Pavlov je istraživao mehanizme interakcije karnozina sa superoksidnim radikalom. Korištena metoda bila je pulsna radioliza uz pomoć elektronskog akceleratora pri kojoj se vršilo brzo spektrofotometrijsko mjerenje međuprodukata oksidacije kisika. Karnozin je sa superoksidnim radikalom stvorio kompleks koji je ujedno i smanjio reaktivnost tog radikala. Ovakvo se djelovanje pokazalo čak i pri niskim koncentracijama karnozina [18]. Kako je jedan od međuprodukata oksidacije kisika hidroksilni radikal, Pavlov je proučavao i njega. Karnozin je reagirao sa hidroksilnim radikalom i to brzinom od $9 \bullet 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$ [18] (Slika 9.). Popov je također istraživao interakciju superoksidnog radikala s karnozinom. Promatran je utjecaj antioksidansa na jačinu kemoluminiscencije luminola. Osim karnozina, korišteni su superoksid dismuntaza (SOD), askorbinska te mokraćna kiselina. Karnozin je smanjio djelovanje luminola, dokazavši tako svoje antioksidativno djelovanje. Međutim, zanimljivim se pokazalo što karnozin nije samo smanjio jačinu luminiscencije luminola, već je također produljio vrijeme početnog zaostajanja efekta. To je važno za spomenuti jer je SOD pokazala samo smanjenje jačine luminiscencije, dok su mokraćna i askorbinska kiselina isključivo produljile period usporenog efekta reakcije [19]. U drugom eksperimentu proučavalo se antioksidativno djelovanje karnozina na superoksidni radikal nastao ksantin oksidazom. Rezultati su se pokazali slični kao i u superoksid dismutaze. Pokazalo se antioksidativno djelovanje, ali ne vrlo jako [19]. Međutim, to ne umanjuje vrijednost karnozina kao antioksidansa. Mnogi antioksidansi uopće ne reagiraju sa superoksidom, djeluju vrlo slabo ili se pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama što je posebice slučaj u mišićima. Karnozin je stoga dobar antioksidans za mišićne stanice jer reagira sa superoksidom, a koncentracija u tkivu mu je veća od ostalih antioksidansa. Primjerice, koncentracija karnozina u mozgu i mišićima je 5-40 mM, a vitamina E je 10-40 μM [19].



Slika 9. Reakcija karnozina s hidroksilnim radikalom [13].

Dugo se vremena smatralo da je karnozin iznimno jak antioksidans u borbi protiv peroksilnih radikala, ali se kasnije pokazalo da se u eksperimentalnim istraživanjima koristio nečisti karnozin koji je u svojoj strukturi sadržavao hidrazin, jak reducens sa sposobnošću uklanjanja radikala. Decker je uspio izolirati čisti karnozin reakcijom s heksanalom [20]. On reagira s hidrazinom ostavljajući karnozin nepromijenjenim. Tako pročišćen karnozin, kao i njegove sastavnice L-histidin te β-alanin stavljeni su u reakciju s peroksilnim radikalima iz 2-amidopropana i fluorometrijski su im mjerena antioksidativna djelovanja. Pokazalo se da karnozin i histidin uklanjaju peroksilne radikale, dok β-alanin na njih ne djeluje, što znači da je za antioksidativno djelovanje karnozina protiv peroksilnih radikala zaslužan upravo histidinsi dio molekule [20]. Mjerena je i sposobnost nekih antioksidansa da uklone aldehid heksanal nastao lipidnom peroksidacijom. Među karnozinom, glutationom, sperminom te spermidinom, karnozin se pokazao kao najmanje aktivan. Unatoč tome, on ipak ima najveći potencijal uklanjanja toksičnih aldehida jer mu je koncentracija u poprečno-prugastim mišićima 40-900 puta veća nego ostala tri ispitivana uzorka [20]. Hipkiss je proučavao antioksidativno djelovanje karnozina na hipoklorit [21]. Tri proteina, goveđi serumski albumin (BSA), ovalbumin te α-kristalin tretirani su hipokloritom. Uzorci su inkubirani i dodane su različite koncentracije karnozina u svaku epruvetu. Rezultati eksperimenta s hipokloritom prikazani su za α-kristalin. Produkti reakcije bili su ukršteni proteini. Slika 10. prikazuje kako je karnozin inhibirao djelovanje hipoklorita. Uzorak 1 i 10 su slijepe probe. Uzorci 2-9 tretirani su karnozinom s koncentracijama od 0 mM za uzorak 2; 0.1 mM uzorak 3; 0.5 mM uzorak 4; 1.0 mM uzorak 5; 2.0 mM uzorak 6; 5.0 mM uzorak 7; 10 mM uzorak 8 te 20 mM uzorak 9. Hipkiss nije utvrdio mehanizam djelovanja karnozina na hipoklorit, imao

je samo pretpostavke [21]. Pattison je pokazao kako karnozin, i drugi spojevi koji sadrže imidazolni prsten i slobodan amino kraj, s hipokloritom tvore kloramine [25].



Slika 10. Rezultati reakcije alfa-kristalina s hipokloritom uz različite koncentracije karnozina u uzorcima [21].

Karnozin djeluje i na singletni kisik. Hartman je singletnom oksidu izložio ~30 proteina koji u strukturi sadrže imidazolski prsten. Singletni kisik dobiven je izlaganjem bojila fenosafranina svjetlosti, stavljajući ga u pobuđeno stanje. Rezultati su pokazali da je karnozin reagirao sa singletnim kisikom dvostruko do četverostruko brže od samostalnog L-histidina te dvostruko brže od dipeptida koji sadrže histidin na N-terminalnom kraju. Nadalje, karnozin je pokazao stabilnu i jednoliku brzinu reakcije, dok su drugi dipeptidi reagirali sporadično [26].

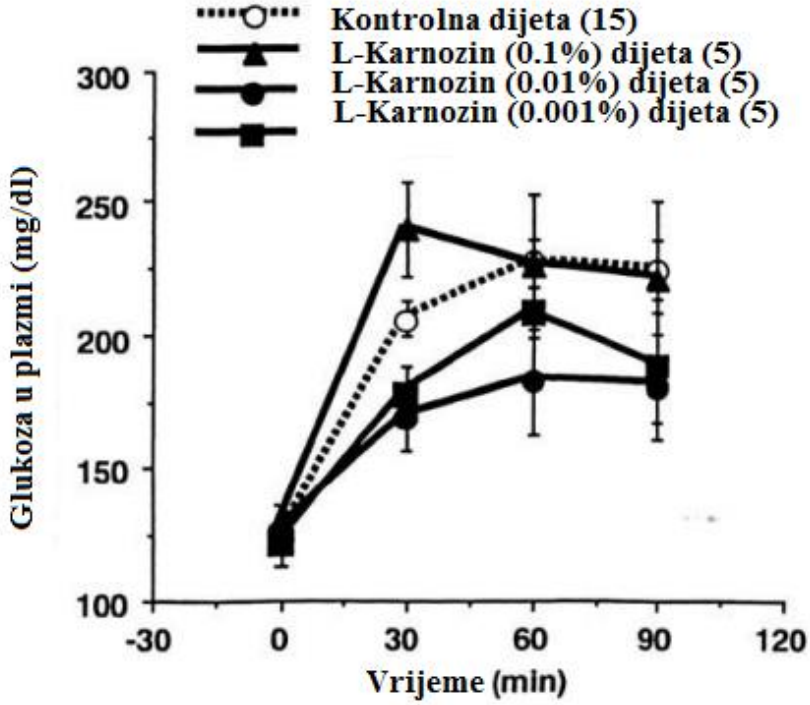
Antioksidativnost karnozina ne manifestira se isključivo njegovom sposobnošću uklanjanja štetnih tvari. Karnozin također i pojačava antioksidativni utjecaj drugih spojeva, uglavnom enzimskih. U jednom istraživanju mjerile su se koncentracije MDA, GPx, vitamina E i C, SOD i dr. [27]. Nakon jednomjesečnog suplementiranja štakora karnozinom dozom od 250 mg/kg dnevno koncentracija MDA u jetri se znatno smanjila, što ukazuje na antioksidativno djelovanje, a koncentracije vitamina E i SOD-a u jetri starijih štakora vidljivo su se povećale [27]. Istraživanje na 72 svinje približno iste težine vršilo se u trajanju od 8 tjedana. U prehranu svinjskih subjekata dodavane su doze karnozina od 0, 25, 50 te 100 mg/kg. Subjekti koji su tretirani najvećom dozom pokazali su

pozitivne rezultate. Koncentracije GPx i SOD u plazmi, jetri i mišićima su povećane [28].

5.1. Liječenje Dijabetesa

Dijabetes je bolest uzrokovana nedostatkom inzulina u tijelu. Inzulin je hormon kojim se glukoza apsorbira u tijelu te se njegovim odsutstvom glukoza nakuplja u krvi. Postoje dvije vrste dijabetesa: tip 1 (tijelo ne proizvodi inzulin) i tip 2 (tijelo ne proizvodi dovoljno inzulina) [29]. Primijećeno je kako su oksidativni stres i hiperglikemija povezani jer se pojavljuju u stanju dijabetesa. Prva je to proučila Yin tijekom istraživanja na dijabetičnim miševima u kojem su miševi unosili karnozin kroz period od četiri tjedna pijenjem vode, u dozama od 0.5 te 1 g/L. Razina karnozina u plazmi, srcu i jetri se povećala dok se razina glukoze smanjila. Pri većoj dozi (1 g/L) povećala se koncentracija inzulina u plazmi [22].

U japanskom istraživanju iz 2003. godine štakorima je ubrizgana 2-deoksi-D-glukoza u mozak (lateralnu moždanu komoru) izazvavši hiperglikemiju [23]. Injekcija 2-deoksi-D-glukoze u moždanu komoru uzrokuje hiperglikemiju tako što djeluje na autonomni sustav. Aktivira simpatikus, a inhibira parasimpatikus što izaziva lučenje adrenalina i glukagona, a inhibira lučenje inzulina. U prehranu subjekata dodane su doze od 0.1, 0.01 te 0.001 g karnozina/100 g obroka. Rezultati su pokazali kako je u dozama od 0.01 te 0.001 g karnozina/100 g obroka razina glukoze u krvi manja od razine u uzorcima bez karnozina u prehrani (Slika 11.). Istraživanjem je ustanovljeno kako karnozin djeluje suprotno od 2-deoksi-D-glukoze, on inhibira rad simpatikus te aktivira parasimpatikus [23].



Slika 11. Razine glukoze u krvi hiperglikemičkih štakora u ovisnosti o vremenu, pri različitim koncentracijama karnozina u tijelu [23].

5.2. Liječenje Parkinsonove bolesti

Parkinsonova bolest je neurodegenerativni poremećaj središnjeg živčanog sustava uzrokovan gubitkom neurona i karakterizira ju teškoća pri kretanju i održavanju položaja tijela te tremor pri mirovanju [30]. Odumiranje dopaminergičnih neurona rezultira ispuštanjem velikih količina slobodnog dopamina čija je oksidacija praćena stvaranjem reaktivnih kisikovih jedinica i razvijanjem oksidativnog stresa [24]. Boldyrev je izvršio kliničko ispitivanje na 36 pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti [24]. Pacijenti su podijeljeni u dvije grupe od kojih je jedna primala samo osnovnu terapiju, a druga grupa je uz osnovnu terapiju konzumirala i suplemente karnozina, u dozi od 1.5 g dnevno kroz 30 dana. Neurološko stanje pacijenata određeno je prije početka istraživanja te su uzeti uzorci krvi, a isto je napravljeno i nakon kraja. Za određivanje neurološkog stanja korištena je UPDRS skala kojom se proučavaju lokomotorne sposobnosti, dnevna aktivnost, mobilnost nogu, tremor i drugi parametri. Prije početka uzimanja terapije, neurološki simptomi pacijenata iznosili su 38.9 bodova na UPDSR skali. Nakon završetka terapije, poboljšanje kvalitete kretanja iznosilo je 16.5% za pacijente kojima je određena osnovna terpaija, a 36% za pacijente koji su također konzumirali i karnozin (Slika 12.). Iz uzoraka krvi određeno je oksidativno stanje pacijenata mjereći koncentraciju superoksid dismutaze, razinu proteinskih karbonila te razinu oksidiranih krvnih lipoproteina. Osnovna terapija

rezultirala je slabljenjem aktivnosti superoksid dismutaze dok je karnozin u drugoj terapiji potaknuo aktivaciju iste. Količina oksidiranih proteina veća je u ljudi oboljelih od Parkinsonove bolesti nego u zdravih ljudi. Osnovna terapija nije pridonijela smanjenju te količine, ali karnozin je u drugoj grupi pacijenata znatno smanjio njihovu koncentraciju [24].

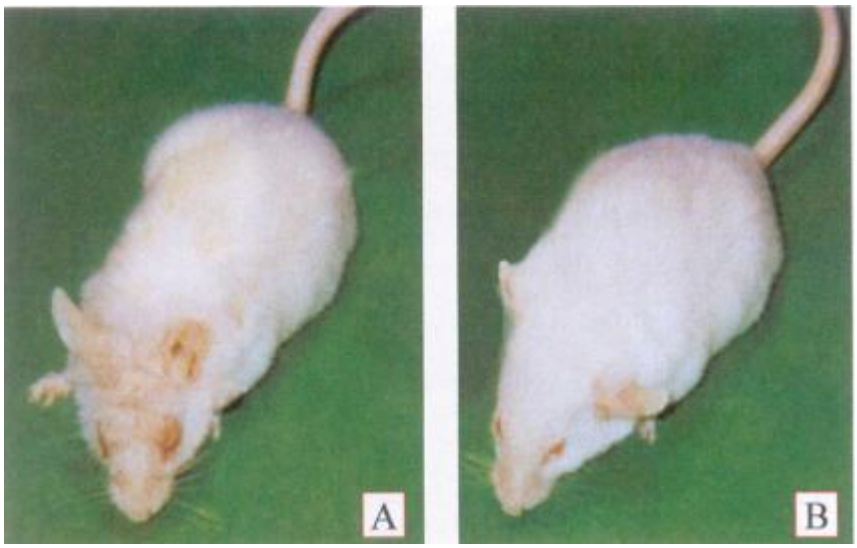
Tablica 2. Utjecaj terapije karnozinom na parametre Parkinsonove bolesti na UPDSR skali [24].

Parametar	Obična terapija	Obična terapija + karnozin	% smanjenja	P vrijednost
Krutost ruku	2.04 ± 0.2	1.38 ± 0.3	32	0.077
Krutost nogu	1.41. ± 0.2	0.88 ± 0.2	38	0.073
Pokreti ruku	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.3	37	0.082
Brzi izmjenjujući pokreti ruku	1.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2	47	0.015
Agilnost nogu	1.8 ± 0.2	0.85 ± 0.20	53	0.005
Dnevne aktivnosti	11.4 ± 1.2	7.8 ± 0.8	32	0.009
Motoričke sposobnosti	22.5 ± 2.8	14.8 ± 1.7	34	0.039

5.3. „*Anti-aging*“ svojstva karnozina

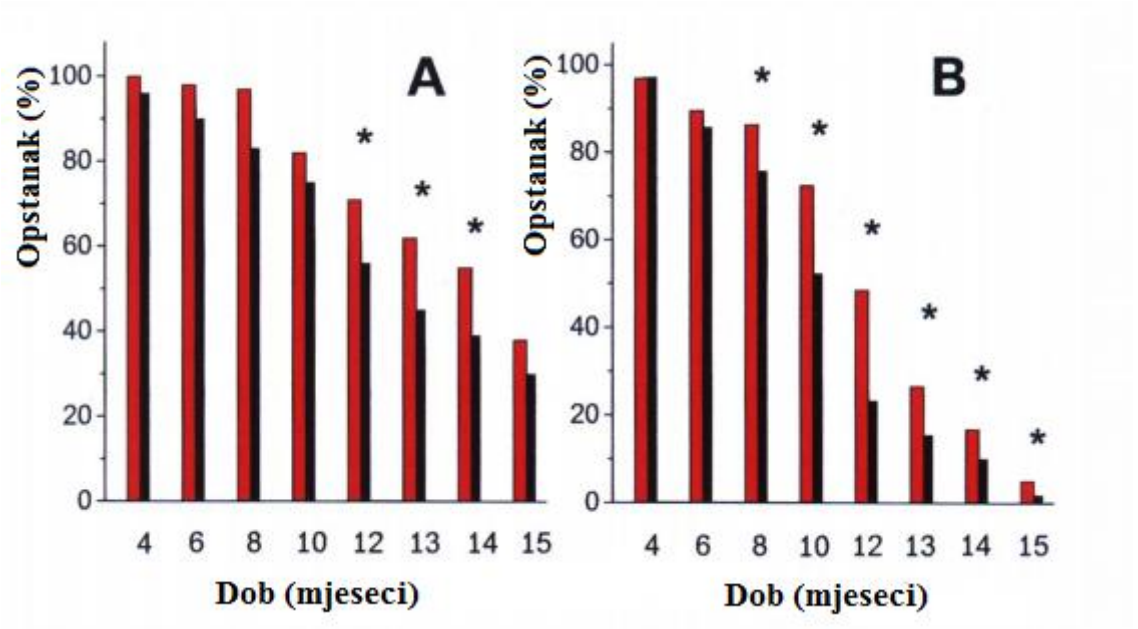
Zanimanje za suplemente karnozina posljednjih je godina poraslo zbog njegovih potencijalnih djelovanja protiv starenja. Boldyrev je pripisao „*anti-aging*“ djelovanje karnozina njegovim antioksidativnim svojstvima [31]. On je izvršio eksperiment na SAM miševima (eng. *Senescence Accelerated Mice*, miševi sa ubrzanim starenjem). Ova vrsta miševa posebna je po svom fenotipu kojeg karakteriziraju gubitak dlake, oslabljena aktivnost i rana smrt. Istraživanja su pokazala da im je životni vijek kratak jer nemaju dobro razvijen antioksidativni obrambeni mehanizam pa im se u tkivima nakupljaju ROS i uzrokuju nekrozu stanica [31]. U drugom Boldyrevovom istraživanju sudjelovalo je 160 miševa sklonih ubrzanom starenju (SAMP) i 160 miševa otpornih na ubrzano starenje (SAMR) [32]. SAMP i SAMR miševi podijeljeni su u skupine od po 80 miševa od kojih se jedna hranila uobičajenom prehranom, a drugoj je u prehranu dodana doza od 100 mg karnozina po tjelesnoj težini. Kroz trajanje istraživanja, praćene su promjene u fizičkim karakteristikama te mortalitet miševa. U starosti od 10 mjeseci,

SAMR miševi tretirani karnozinom pokazali su reaktivnost od 53%, dok su miševi koji nisu tretirani karnozinom pokazali vrlo nisku reaktivnost od 27%. Među SAMP miševima uočene su fizičke promjene. Od svih SAMP miševa koji su konzumirali karnozin u svojoj prehrani, 14% ih je razvilo čireve na koži, a u skupini SAMP miševa bez unošenog karnozina bilo ih je 36% (Slika 13.) [32].



Slika 12. SAMP miševi bez tretmana karnozinom (A) i SAMP miševi tretirani karnozinom (B)[32].

Jasno su se pokazale i razlike u mortalitetu između miševa koji su tretirani karnozinom i onih koji to nisu. Tretirani miševi u obje grupe živjeli su duže od netretiranih, a u SAMP grupi ta razlika je iznosila čak 20% (Slika 14.) [32].



Slika 13. Opstanak SAMR (A) i SAMP (B) grupe miševa te razliku u opstanku različito tretiranih miševa unutar obje grupe, gdje su crveno prikazani miševi tretirani karnozinom, a crno miševi koji to nisu [32].

6. Zaključak

Histidinski dipeptid karnozin ističe se svojim sposobnostima djelovanja protiv reaktivnih kisikovih spojeva, uzročnika oksidativnog stresa. Mehanizmi oksidativnog stresa kao što su lipidna peroksidacija i mehanizam oksidacije DNA započinju stvaranjem hidroksilnog radikala, $^{\cdot}OH$ kojeg karnozin brzo reducira. U usporedbi s drugim antioksidansima, karnozin se istaknuo kao najučinkovitiji za uklanjanje superoksidnog radikala, $O_2^{\cdot -}$ jer ima najveću mišićnu koncentraciju. Iz istog razloga smatra se i dobrim odstranjivačem heksanala, produkta lipidne peroksidacije. Karnozin uklanja singletni kisik, $^1O_2$ brže i stabilnije od drugih histidinskih dipeptida. Pokazalo se da je najaktivnije mjesto na karnozinu imidazolni prsten koji sudjeluje u reakcijama sa singletnim kisikom, hipokloritom te hidroksilnim radikalom.

Rezultati nekoliko istraživanja o utjecaju suplementacije karnozinom u liječenju dijabetesa i Parkinsonove bolesti te o „*anti-age*“ efektima karnozina jasno prikazuju da ovaj prirodno postojeći dipeptid pozitivno pridonosi liječenju te da usporava starenje organizma. Karnozin je relativno nov predmet istraživanja u kemiji i medicini te mehanizmi njegovog djelovanja nisu u potpunosti jasni. Može se zaključiti da karnozin posjeduje jaka antioksidativna svojstva i da je njegova potencijalna primjena u liječenju bolesti iznimno bogata zbog čega je intenzivni nastavak njegova istraživanja od neizmjerne važnosti.

7. Literatura

1. S. H. Pine, *Organska kemija,* Školska knjiga, Zagreb, 1994.
2. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidić, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović, Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, *Medicina* 43 (2007) 84.
3. M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry* 266 (2004) 37.
4. T. Özben, *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*, Springer US, New York, 1998.
5. M. DeRosa, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews* 233-234 (2002) 351.
6. D. A. Kostić, D. S. Dimitrijević, G. S. Stojanović, I. R. Palić, A. S. Đorđević, J. D. Ickovski, Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition, *Journal of Chemistry* 2015 (2015) 1.
7. L. Stryer, *Biochemistry*, W.H.Freeman and Company, New York, 1995.
8. E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *The World Allergy Organization journal* 5 (2012) 9.
9. Lushchak, I. Volodymyr, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico-biological interactions* 224 (2014) 164.
10. https://hrcak.srce.hr/344 (2.9.2018.)
11. https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/690545.fig.001.jpg (1.9.2018.)
12. https://i.stack.imgur.com/X1byF.gif (11.9.2018.)
13. A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave, Physiology and pathophysiology of carnosine, *Physiological reviews* 93 (2013) 45.
14. G. Kralik, M. Sak-Bosnar, Općenito o karnozinu, *Krmiva* 54 (2012) 159.
15. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carnosine#section=Experimental-Properties (2.9.2018.)
16. M. C. Jackson, J. F. Lenney, The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues, *Inflammation Research* 45 (1996) 132.
17. K. M. Chan, E. A. Decker, C. Feustman, Endogenous skeletal muscle antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34 (1994) 403.
18. A. R. Pavlov, A. A. Revina, A. M. Dupin, A. A. Boldyrev, A. I. Yaropolov, The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1157 (1993) 304.

19. G. I. Klebanov, Y. O. Teselkin, I. V. Babenkova, I. N. Popov, G. Levin, O. V. Tyulina, Y. A.Vladimirov, Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *IUBMB Life* 43 (1993) 99.
20. E. A. Decker, S. A. Livisay, S. Zhou, A Re-evaluation of the Antioxidant Activity of Purified Carnosine, *Biochemistry (Moscow) 65* (2000) 766.
21. A.. R. Hipkiss, V. C. Worthington, D. T. J. Himsworth, W. Herwig, Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1380 (1998) 46.
22. Y. Lee, C. Hsu, M. Lin, K. Liu, M. Yin, Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation, *European Journal of Pharmacology* 513 (2005) 145.
23. K. Nagai, A. Niijima, T. Yamano, H. Otani, N. Okumra, N. Tsuruoka, Y. Kiso, Possible Role of L-Carnosine in the Regulation of Blood Glucose through Controlling Autonomic Nerves, *Experimental Biology and Medicine* 228 (2003) 1138.
24. A. Boldyrev, T. Fedorova, M. Stepanova, I. Dobrotvorskaya, E. Kozlova, N. Boldanova, S. Illarioshkin, Carnisone Increases Efficiency of DOPA Therapy of Parkinson's Disease: A Pilot Study, *Rejuvenation Research* 11 (2008) 821.
25. D. I. Pattison, M. J. Davies, Evidence for Rapid Inter- and Intramolecular Chlorine Transfer Reactions of Histamine and Carnosine Chloramines: Implications for the Prevention of Hypochlorous-Acid-Mediated Damage†, *Biochemistry* 45 (2006) 8152.
26. P. E. Hartman, Z. Hartman, K. T. Ault, Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid, *Photochemistry and Photobiology* 51 (1990) 59.
27. A. F. Aydın, C. Küçükgergin, G. Özdemirler-Erata, N. Koçak-Toker, M. Uysal, The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats, *Biogerontology* 11 (2009) 103.
28. X. Y. Ma, Z. Y . Jiang, Y. C. Lin, C. T. Zheng, G. L. Zhou, Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94 (2010) 286.
29. https://medlineplus.gov/diabetes.html (30.8.2018.)
30. https://medlineplus.gov/ency/article/000755.html (30.8.2018.)
31. E. Bulygina, S. Gallant, G. Kramarenko, S. Stvolinsky, M. Yuneva, A. A. Boldyrev, Characterization of the Age Changes in Brain and Liver Enzymes of Senescence-

Accelerated Mice (SAM), *Journal of Anti-Aging Medicine* 2 (1999) 43.

32. A. A. Boldyrev, S. C. Gallant, G. T. Sukhich, Carnosine, the protective, anti-aging peptide, *Bioscience reports* 19 2000 7.