

# Karnozin - “eliksir mladosti”: derivati, primjena i strukturalna svojstva

---

Ivančić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:985031>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ana Ivančić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Karnozin – „eliksir mladosti“: derivati, primjena i strukturna svojstva**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Zagreb, godina 2021.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

2. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2021.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Karnozin - strukturna građa.....</b>	<b>1</b>
1.1.2. Biosinteza i biorazgradnja karnozina .....	1
<b>§ 2. KARNOZIN - „ELIKSIR MLADOSTI“.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Svojstva karnozina.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Karnozin kao fiziološki pufer .....	3
2.1.2. Antioksidativna svojstva.....	5
2.1.3. Kelacija prijelaznih metala.....	5
2.1.4. Koordinacijski spojevi bakra(II) s karnozinom.....	5
2.1.5. Koordinacijski spojevi cinka(II) s karnozinom .....	7
2.1.6. Koordinacijski spojevi s ostalim metalima .....	8
<b>2.2. Fiziološka uloga karnozina.....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Uloga L-karnozina u poprečno prugastom mišićnom tkivu.....	8
2.2.2. Uloga L-karnozina u regulaciji sprege podraživanja i kontrakcije mišića.....	9
2.2.3. Uloga karnozina u živčanom sustavu.....	9
<b>2.3. Primjena karnozina .....</b>	<b>10</b>
2.3.1. Karnozin i razvoj raka .....	10
2.3.2. Primjena u medicini i farmaciji .....	10
2.3.3. Primjena u kozmetici.....	11
2.3.4. Primjena u nutricionizmu.....	12
2.3.5. Metaloorganske mreže karnozina i cinka(II) .....	12
<b>2.4. Derivati karnozina .....</b>	<b>14</b>
2.4.1. Derivati na amino-skupini .....	14
2.4.2. Derivati na karboksilnoj skupini.....	17
2.4.3. Derivati D-karnozina .....	17
2.4.4. Koordinacijski spojevi derivata karnozina .....	18
<b>2.5. Pogled u budućnost .....</b>	<b>18</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XIX</b>



## § Sažetak

L-karnozin je endogeni dipeptid koji je najrasprostranjeniji u živčanom i mišićnom tkivu ljudi. Dipeptid je proteinogene aminokiseline L-histidina i neesencijalne aminokiseline  $\beta$ -alanina. Može služiti kao fiziološki pufer, antioksidans, neurotransmiter, antiglikacijski agens i kelator metalnih iona. Polidentatni je ligand sa šest potencijalnih veznih mjesta: dva dušikova atoma imidazolnog prstena, jedan kisikov atom karboksilne skupine, jedan dušikov atom amino skupine te dušikov i kisikov atom peptidne veze. Može stvarati koordinacijske spojeve s ionima bakra, nikla, cinka, kobalta, mangana, kalcija, magnezija i vanadija. Opisano je nekoliko struktura koordinacijskih spojeva biogenih metala s karnozinom u čvrstom stanju i brojne u otopinama. Primjenu ima u medicini, kozmetici i sportskom nutricionizmu. Koristi se za liječenje čireva na želucu i drugih lezija na gastrointestinalnom traktu. Iako još nisu poznate sve fiziološke uloge L-karnozina, smatra se da je njegova uloga u tijelu vrlo važna. Rasprostranjenost u tkivima koja mogu primiti podražaje ukazuje na njegovu moguću ulogu u prijenosu signala.

Derivati karnozina istraživani su zbog nemogućnosti generiranja većih koncentracija L-karnozina u tkivima zbog njegove razgradnje karnozinazama. Sintetizirani su derivati na amino- i na karboksilnoj skupini s raznovrsnim spojevima kako bi se dobili novi spojevi koji imaju kombinirana svojstva karnozina i drugih spojeva. Istraživan je i njegov enantiomer, D-karnozin i njegovi derivati.

Istražuju se i strukture metaloorganskih mreža biogenih iona metala i molekula karnozina kao endogenih poveznica s histidinskom podjedinicom i imidazolnim prstenom kao potencijalni porozni sustavi metal-karnozin, a malobrojni su do sada detaljnije opisani.

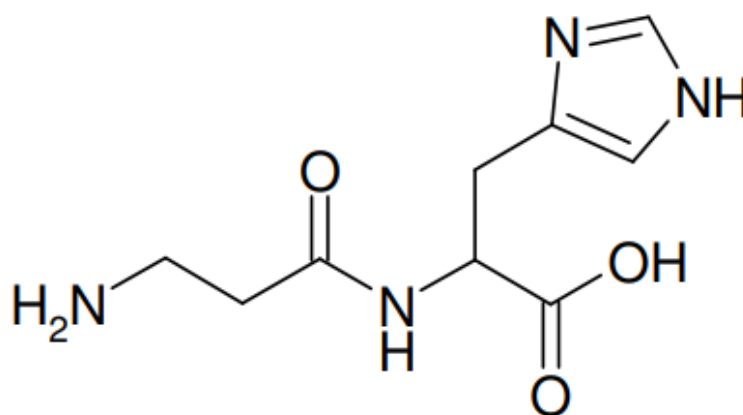




## § 1. UVOD

### 1.1. Karnozin - strukturna građa

L-karnozin je endogeni dipeptid L-histidina i  $\beta$ -alanina (slika 1) koji se prirodno nalazi u mišićnom i živčanom tkivu više vrsta životinja, uključujući čovjeka.<sup>1</sup> Otkrio ga je ruski kemičar V. S. Gulevich 1900. godine tražeći molekule koje sadrže dušik u ekstraktu mesa.<sup>2</sup>



Slika 1. Strukturna formula molekule karnozina (slika je preuzeta iz literaturnog izvora 3).

#### 1.1.1. Uvod u svojstva i primjenu

Pretpostavljeno je i kasnije utvrđivano da ovaj dipeptid ima antioksidativna svojstva, svojstva fiziološkog pufera, kelacije metalnih iona, pronalaska i smanjenja aktivnosti radikala, promocije zarastanja, antiglikacije, kao i „anti-age“ djelovanje.<sup>1,2,4,5</sup> Zbog toga očekivano je da ima potencijal pri liječenju bolesti koje se javljaju starenjem, kao Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, moždani udar, osteoporoza, katarakt, dijabetes tipa 2. Kod zdravih osoba pokazano je da umanjuje mentalni i fizički umor.

#### 1.1.2. Biosinteza i biorazgradnja karnozina

Biosintezu karnozina katalizira karnozin-sintetaza iz  $\beta$ -alanina i L-histidina uz hidrolizu ATP-a u tkivima koja dobivaju podražaje kao što su mišićna i živčana tkiva, zbog čega se većina karnozina u organizmu nalazi u poprečno prugastim mišićima.<sup>6</sup> Osim ATP-a, karnozin-sintetazi potreban je ion magnezija ( $Mg^{2+}$ ) kao kofaktor. Njegova hidroliza katalizirana je dvama vrstama karnozinaza, karnozinazom iz tkiva to jest citosola i onom iz krvi to jest seruma.<sup>7</sup>

Karnozinaza katalizira hidrolizu peptidne veze između  $\beta$ -alanina i L-histidina. Otkriveno je da određena tkiva ili imaju mogućnost sinteze karnozina ili mogućnost njegove razgradnje, no nikad obje mogućnosti što ukazuje da tkiva u kojima se sintetizira mogu otpustiti karnozin u tkiva u kojima se može razgraditi.<sup>2</sup>

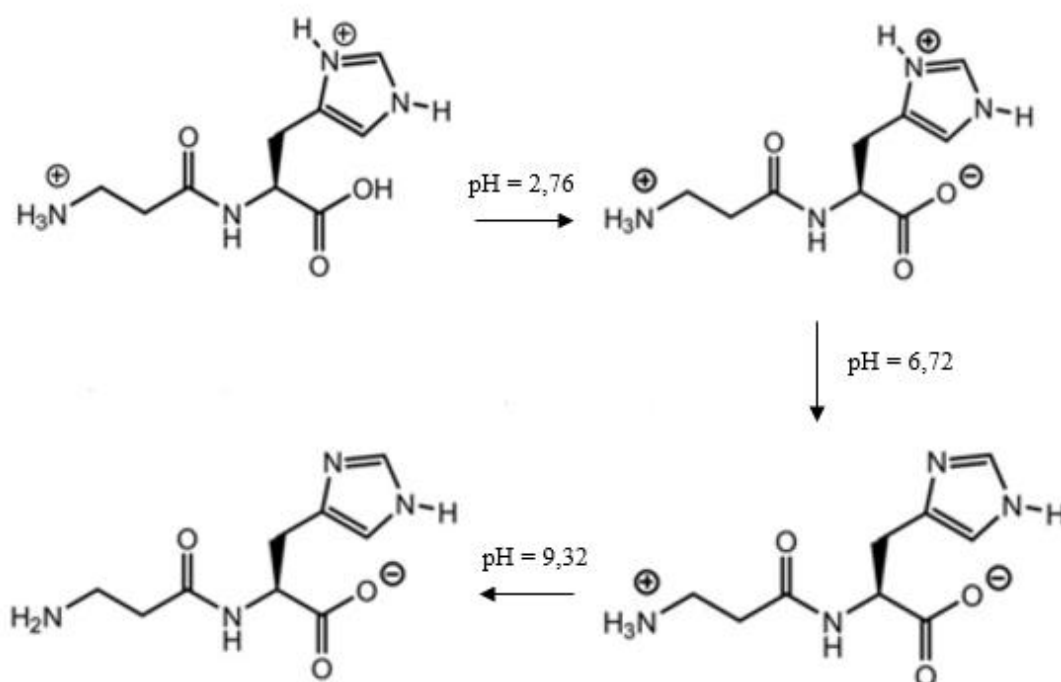
## § 2. KARNOZIN - „ELIKSIR MLADOSTI“

### 2.1. Svojstva karnozina

Karnozin je zanimljiv zbog svoje raznolike primjenjivosti u medicini odnosno farmaciji, sportskom nutricionizmu, kozmetici i drugim područjima. Razlozi njegove široke potencijalne uporabe proizlaze iz njegove strukturne građe odnosno svojstava koja iz nje proizlaze.

#### 2.1.1. Karnozin kao fiziološki pufer

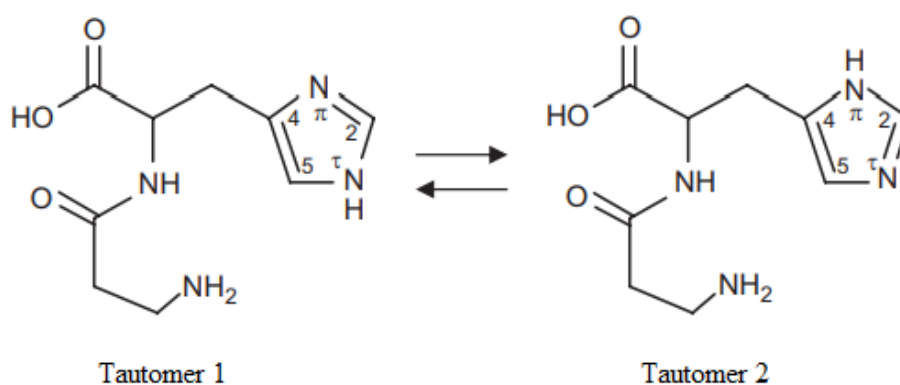
Karnozin je vrlo dobro topljiv u vodi (1 g u 3,1 mL vode pri 25 °C). Molekula karnozina ima tri ionizirajuće skupine, amino- ( $pK_a = 9,32$ ), imidazolnu ( $pK_a = 6,72$ ) i karboksilnu skupinu ( $pK_a = 2,76$ ). S obzirom na  $pK_a$  vrijednosti molekula karnozina je pri fiziološkom pH gotovo sva u zwitterionskom obliku. Pri pH-vrijednosti višoj od fiziološke počinje deprotonacija jednog od dušikovih atoma imidazolnog prstena.



Slika 2. Strukturne formule L-karnozina kao kationa, zwitteriona i aniona u pripadnim područjima pH-vrijednosti s prikazanim nabojima pojedinih atoma (slika je prilagođena i preuzeta iz izvora 8).

Kako je imidazolna skupina važna za kemiju karnozina, uključujući i njegovu pufersku funkciju, Ramanovom spektroskopijom utvrđeno je da su pri pH-vrijednosti 7,00 prisutni i pozitivni, i neutralni oblik te skupine.

Zwitterionski karnozin ima dva tautomera koji se razlikuju po položaju protona u imidazolnom prstenu (slika 3) i međusobno su u ravnoteži, no u otopini veći je udio tautomera 1, koji je stabilniji od tautomera 2. Kelacija metala utječe na ravnotežu između tautomera, kao na primjer kod keliranja bakrovih(II) iona gdje je stabilniji drugi tautomer zbog nastajanja dimernog kompleksa i jer je utvrđeno da dušikov atom koji je kod tautomera 1 protoniran ( $N_{\tau}$ ) sudjeluje u vezanju iona metala.<sup>2</sup>



Slika 3. Tautomeri molekule karnozina s označenim atomima imidazolnog prstena, tautomeri se razlikuju po položaju vodikova atoma između dva dušikova atoma označena kao  $\pi$  i  $\tau$  (slika je prilagođena i preuzeta iz literaturnog izvora 2).

Prilikom vježbanja dolazi do akumulacije protona u mišićima što za posljedicu ima snižavanje pH-vrijednost i dovodi do umora mišića. Akumulacija vodikovih iona u mišićima, odnosno zakiseljavanje mišića naziva se acidoza. Što je veća ovisnost o anaerobnoj glikolizi, to je veći udio mliječne kiseline koja pri ionizaciji na hidron i laktat snižava pH-vrijednost. Usporavanjem zakiseljavanja mišićnog tkiva smanjuje se umor mišića. U tu svrhu istraživani su  $\beta$ -alanin, neesencijalna aminokiselina koja je prekursor karnozina uz L-histidin. Kao i karnozin, prirodno se nalazi u tijelu, no otkriveno je da se uzimanjem suplemenata koji sadrže  $\beta$ -alanin može povećati koncentracija karnozina u tkivima. Karnozin kao prirodni pufer može spriječiti naglo zakiseljavanje mišićnog tkiva. Njegova uloga u pufiranju mišića nije samostalna, puferskoj aktivnosti pridonose i drugi histidinski spojevi, proteini te anorganske molekule poput hidrogenkarbonata i fosfata. Nije potpuno sigurno koliko sam karnozin pridonosi

puferskoj aktivnosti, no karnozin je mobilna molekula čime pomaže u održavanju homeostaze i prevenciji velikih razlika u pH-vrijednosti.<sup>9</sup>

### 2.1.2. Antioksidativna svojstva

Osim puferske, važna aktivnost za održavanje homeostaze je antioksidativna. U procesu prijenosa elektrona niz respiratorni lanac do molekule kisika kao nusprodukti mogu nastati reaktivne kisikove vrste kao peroksidni anion ( $O_2^{2-}$ ), superoksidni radikal anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) i druge. U ljudskom tijelu postoje enzimi (katalaza, superoksid-dismutaza) i molekule (glutation) koji djeluju na te reaktivne vrste kako bi zaštitili organizam od oksidativne štete.

Predloženo je da bi karnozin preko različitih mehanizama također mogao pomoći u smanjenju oksidativne štete. Ti mehanizmi uključuju kompleksiranje metalnih iona i pronalaženje samih radikala. Istraživanja *in vivo* na štakorima su pokazala kako terapija karnozinom umanjuje oksidativnu štetu tako što povraća bazalnu razinu glutaciona u krvi te bazalne aktivnosti enzima kao što su glutation-peroksidaza i superoksid-dismutaza. Provedena su druga istraživanja u kojima je pokazano da karnozin pomaže supresiji oksidativne štete koja nastaje kao posljedica prekomjernog unosa etanola u jetri, kao i da djeluje kao antioksidans u mozgu. Nažalost, nije još utvrđeno ima li endogeni karnozin antioksidativnu aktivnost u organizmu zbog toga što su istraživanja provedena uz suplementaciju odnosno terapiju karnozinom.<sup>2</sup>

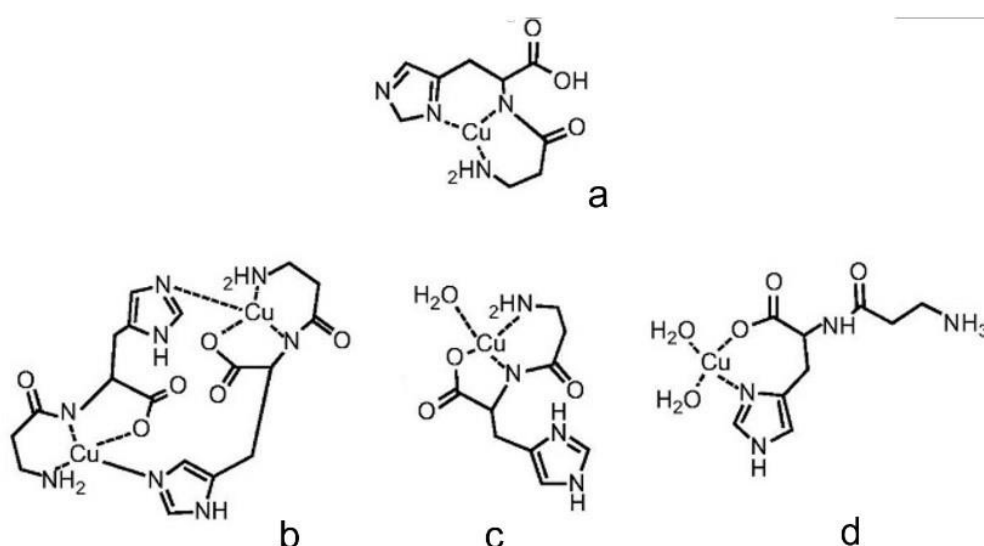
### 2.1.3. Kelacija prijelaznih metala

Prilikom interakcije s metalnim kationima molekula karnozina je polidentatni ligand sa šest potencijalnih veznih mjesta, dva imidazolna dušikova atoma, karboksilna skupina, amino-skupina i dušikov atom iz peptidne veze.<sup>7</sup> Istraživano je svojstvo kelacije karnozina s raznim metalnim kationima kao niklovim, bakrovim, kobaltovim, kadmijevim i cinkovim. Svi navedeni metalni kationi u oksidacijskom su stanju II. Najviše su istraživani bakrovi i cinkovi koordinacijski spojevi s karnozinom.

### 2.1.4. Koordinacijski spojevi bakra(II) s karnozinom

H. Dobbie i W. O. Kermack su 1955. godine pretpostavili monomernu strukturu bakrova(II) - karnozin kompleksa u vodenoj otopini. Takva struktura pretpostavlja da je bakrov(II) ion koordinativno vezan na karnozin preko imidazolnog, amino- i peptidnog dušikovog atoma koji pritom tvore dva šesteročlana prstena (slika 4, a). Bitno je naglasiti da je takva koordinacija karnozina na bakrov(II) ion moguća samo pri višim pH-vrijednostima kada su imidazolni i peptidni dušikovi atomi deprotonirani. Rendgenskom strukturnom analizom jediničnih kristala

H. C. Freeman i J. T. Szymanski utvrdili su da je u čvrstoj fazi struktura kompleksa dimerna (slika 4, b), ne monomerna odnosno da je koordinacijski spoj dinuklearn.<sup>2</sup> Terminalna amino-skupina, peptidni dušikov atom i karboksilni kisikov atom jedne molekule dipeptida te imidazolni dušikov atom ( $N_{\pi}$ , slika 3) druge molekule čine četiri koordinacijske veze s bakrovim(II) ionima, dok peto koordinacijsko mjesto u njegovoj kvadratno piramidalnoj geometriji upotpunjuje molekula vode.<sup>7</sup> Svaka je molekula karnozina vezana za dva bakrova(II) iona. Pretpostavljeno je da je dimerna struktura u ravnoteži s monomernom, ali s većim udjelom koordinacijskog spoja u dinuklearnom obliku, što je i potvrđeno ESI-MS (masenom spektrometrijom uz elektrosprej ionizaciju), Ramanovom i IR (infracrvenom) spektroskopijom. Pri neutralnim i bazičnim uvjetima, s karnozinom i bakrovim(II) ionima u molarnom omjeru 1:1, prevladava dimerni oblik  $[Cu_2(car^{2-})_2]$  (slika 4, b) koji je u ravnoteži s monomernim oblikom. Monomerni kompleksi (slika 4, c i d) postoje u otopini pri nižim pH-vrijednostima.



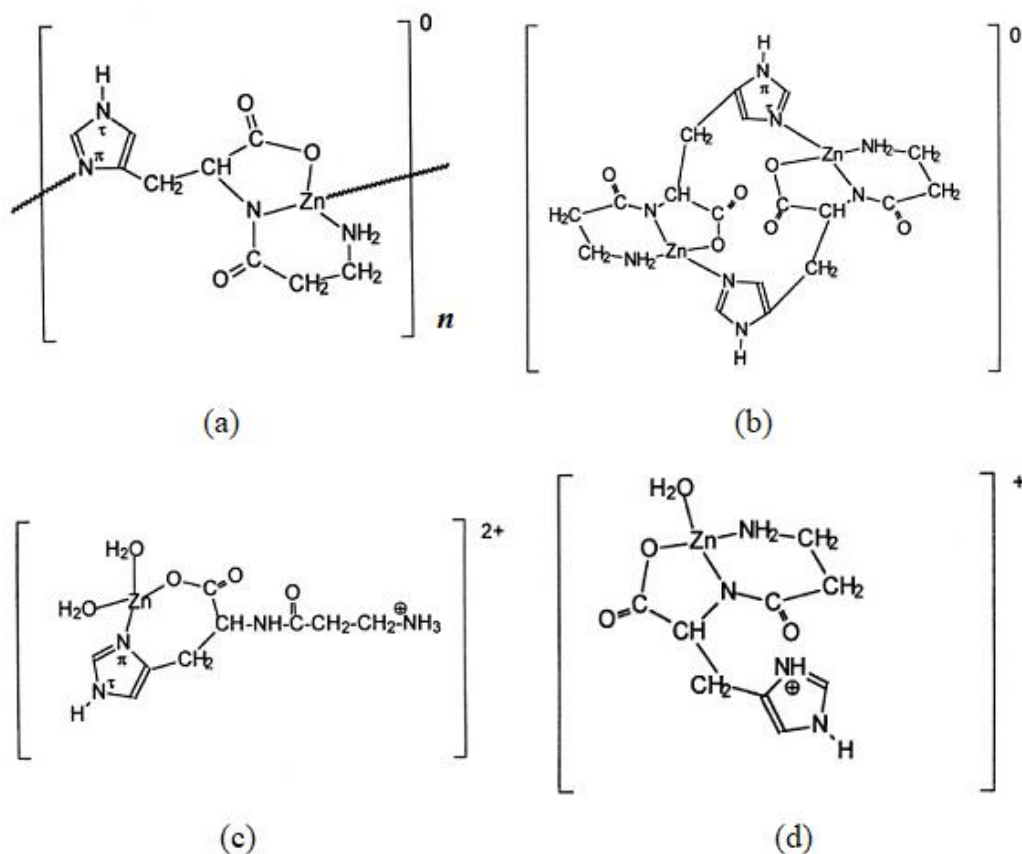
Slika 4. Predložene strukture koordinacijskih spojeva L-karnozina (car) i bakrova(II) iona: a)  $[Cu(car^{2-})]$ , b)  $[Cu_2(car^{2-})_2]$ , c)  $[Cu(car^-(H_2O))]^+$ , d)  $[Cu(car(H_2O)_2)]^{2+}$  (slika je prilagođena i preuzeta iz literaturnog izvora 2).

Većina istraživanja kompleksa iona bakra(II) i karnozina provedena su u vodenim otopinama i s relativno visokim koncentracijama bakrovih iona u odnosu na fiziološku koncentraciju, tako da nije vrlo vjerojatno postojanje dimernog kompleksa u fiziološkim uvjetima što je i potvrđeno  $^1H$ -NMR-om ljudskog mišićnog tkiva. Također je utvrđeno da je manja konstanta nastajanja kompleksa bakra(II) i L-karnozina u odnosu na konstantu nastajanja kompleksa iona bakra(II) i L- histidina.<sup>2</sup>

## 2.1.5. Koordinacijski spojevi cinka(II) s karnozinom

Cink je esencijalni element u tragovima koji je važan aktivni centar za oko 300 enzima u ljudskom tijelu. Osim enzimima, potreban je i translacijskim faktorima koji su ključni u diobi stanice, sintezi proteina kao i regenerativnim sustavima nakon ozljede.<sup>10</sup>

Kompleks karnozina s cinkovim(II) ionima istraživani su zbog farmakološke zanimljivosti. *Polaprezinc* je lijek korišten za liječenje želučanih čireva uzrokovanih bakterijom *Helicobacter pylori*.<sup>2,10,11,12</sup> Topljiv je i stabilan u želučanoj kiselini. Može se „zalijepiti“ za gastritičnu sluz bolje od samog cinka, odnosno L-karnozina.<sup>2,10,12</sup> Sintetizira se reakcijom L-karnozina s cinkovim acetatom uz metanol kao otapalo i uz prisutnost natrijevog metoksida<sup>7,10</sup> ili reakcijom cinkovog(II) hidroksida i L-karnozina.<sup>7</sup>



Slika 5. Predložene strukture koordinacijskih spojeva cinka(II) i L-karnozina (car) u čvrstom stanju (a):  $[Zn(car^{2-})]_n$ , u otopini (b):  $[Zn_2(car^{2-})_2]$ , (c):  $[Zn(car)(H_2O)_2]^{2+}$  (označavanje liganda je u skladu sa slikom 3) i (d):  $[Zn(car^-)(H_2O)]^+$  (slika je preuzeta iz literaturnog izvora 12).

Kompleks nastaje u uskom području pH-vrijednosti. Pri pH-vrijednosti 6 kompleks počinje nastajati, a iznad pH-vrijednosti 7,5 počinje taloženje kompleksa u suvišku liganda. U dobivenom spoju molekula L-karnozina je za cinkov(II) ion koordinirana kao tetradentatni



ligand. Iako postoji sličnost u načinu vezanja kod dinuklearnog kompleksa s bakrom(II) i cinkom(II), stabilnost potonjeg manja je od stabilnosti kompleksa s bakrom(II). Za razliku od bakrovog kompleksa, cinkov nema jednostavnu dimernu strukturu već je ona polimerna (slika 5, a). Na polimernu strukturu ukazuju razlike u bliskom i dalekom području IR spektra.<sup>7</sup>

IR i Ramanovom spektroskopijom istraživani su koordinacijski spojevi cinka(II) i L-karnozina u različitim omjerima metala i liganda i pri različitim pH-vrijednostima. Dinuklearni kompleks  $[\text{Zn}_2(\text{car}^{2-})_2]$  (slika 5, b) je najzastupljenija vrsta pri neutralnoj i bazičnim pH-vrijednostima i u ravnoteži je s pozitivno nabijenim mononuklearnim kompleksom  $[\text{Zn}(\text{car})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  (slika 5, c). Pri kiselim pH-vrijednostima najzastupljenija vrsta je mononuklearni kompleks  $[\text{Zn}(\text{car}^-)(\text{H}_2\text{O})]^+$  (slika 5, d).<sup>12</sup>

#### 2.1.6. Koordinacijski spojevi s ostalim metalima

Osim s bakrom(II) i cinkom(II) opisani su koordinacijski spojevi L-karnozina s kobaltom, i to kobaltom(II) i kobaltom(III), s vanadijem(IV) u obliku oksovanadija(IV), s niklom(II), manganom(II) i kromom(III). Također je utvrđeno postojanje kompleksa s ionima srebra, kadmija(II), magnezija, kalcija i stroncija, kao i olova(II) i žive(II). Kompleks sa željezom(II) i željezom(III) nisu pobliže istraženi. Pretpostavljeno je postojanje nestabilnog kompleksa sa željezom(III), no NMR analiza pokazala je da karnozin ne stvara komplekse ni s ionima željeza(II) ni željeza(III). Kompleksi s kalcijem postoje kao dimeri i kao monomeri.<sup>7</sup> Njihovo je postojanje zanimljivo zbog fiziološke uloge karnozina u sprezi pobude i kontrakcije mišića. Istraživanja koordinacijskih spojeva karnozina s metalnim ionima većinom su izvođena pri uvjetima koji ne odgovaraju fiziološkim, tako da postoji potencijal za daljnje istraživanja karnozina u tom pogledu.<sup>2</sup>

## 2.2. Fiziološka uloga karnozina

Fiziološka uloga L-karnozina zanimljiva je znanstvenicima jer je utvrđeno da njegova uloga nije jednaka u svim tkivima u kojima se endogeno nalazi, a može obavljati i više funkcija u istoj vrsti tkiva. Najviše je proučavana njegova uloga u tkivima u kojima postoji visok udio karnozina odnosno udio dovoljan za obavljanje fizioloških funkcija.<sup>2</sup>

### 2.2.1. Uloga L-karnozina u poprečno prugastom mišićnom tkivu

Istraživanja uloga L-karnozina započela su s istraživanjima njegove uloge u skeletnom mišićnom tkivu, jer je prvo izoliran iz takvog tkiva. Do danas nije sasvim sigurna uloga L-karnozina u mišićnom tkivu unatoč njegovom visokom udjelu.

Provedeni su eksperimenti na mišićnom tkivu žaba te je utvrđeno da se nakon dodatka male koncentracije karnozina smanjuje zamor mišića kao posljedica živčane stimulacije mišića. Taj učinak protiv zamora mišića nazvan je „Severinov fenomen“ prema S. Severinu, učeniku V. Gulevicha.

Jedna od već navedenih važnih fizioloških uloga je njegova pufeska moć. Prilikom vježbanja acidoza u mišićima rezultat je nastanka mliječne kiseline te je jedna od predloženih uloga karnozina ta da puferira tkivo te smanjuje zakiseljavanje što bi mogao biti razlog njegovoj visokoj koncentraciji u skeletnom mišićnom tkivu.

Osim toga predložena je hipoteza da karnozina u poprečno-prugastim mišićima ima najviše zbog toga što je su mišići skladište karnozina u tijelu što objašnjava i visoku ekspresiju gena za karnozin-sintetazu.<sup>2</sup>

### 2.2.2. Uloga L-karnozina u regulaciji sprege podraživanja i kontrakcije mišića

Sprega podraživanja i kontrakcije u mišićnim stanicama je reguliran i kompleksan niz događaja usko vezan uz promjene koncentracije kalcija unutar pojedinih dijelova stanice.<sup>2</sup> Kalcij je ključan u aktiviranju mehanizma kontrakcije mišića. Otpuštanje kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma jedan je od ključnih koraka u kontrakciji mišića. Prilikom opuštanja mišića regenerira se udio kalcija u sarkoplazmatskom retikulumu i stanica čeka novi podražaj.<sup>2,13</sup> Karnozin se pokazao kao utjecajan na osjetljivost kontraktinog aparata na koncentraciju kalcija. Porastom koncentracije karnozina povećava se osjetljivost mišića na kalcij.<sup>2</sup>

### 2.2.3. Uloga karnozina u živčanom sustavu

U mozgu sisavaca od karnozina veća je koncentracija homokarnozina, vjerojatno jer je osim histidina drugi njegov sastavni dio GABA (gama-aminomaslačna kiselina), najrasprostranjeniji i najvažniji inhibitorski neurotransmiter. Karnozina u mozgu ima najviše u njušnoj lukovici (lat. *bulbus olfactorius*) i koncentracija je usporediva s onom u poprečno prugastim mišićima koja iznosi između 5 i 10 mmol dm<sup>-3</sup>. U njušnoj lukovici aktivnost karnozin-sintetaze je pedeset do sto puta veća od aktivnosti tog enzima u ostalim strukturama mozga te deset puta veća od aktivnosti u poprečno prugastim mišićima.

Iako još nije poznat točan razlog postojanja karnozina u mozgu predložene su njegove potencijalne uloge. Postavljene su hipoteze da je karnozin neurotransmiter ili neuromodulator. Neuromodulatorsku ulogu podupiru istraživanja koja su pokazala kolokalizaciju glutamata, koji je neurotransmiter i karnozina u sinaptičkim krajevima mišjih neurona i u stanicama mrežnice žaba. Iako postoje istraživanja koja opovrgavaju izravnu ulogu karnozina u neurotransmisiji,

predloženo je da se njegova modulatorska uloga ostvaruje preko komunikacije neurona i glija stanica. Uz to, mogući razlozi njegovog postojanja u mozgu su njegova antioksidativna i antiglikacijska uloga kao i sposobnost keliranja metalnih iona.<sup>2</sup>

### 2.3. Primjena karnozina

Tijekom djetinjstva glavni je metabolički put za proizvodnju ATP-a (adenozin trifosfata), prvenstvenog izvora energije u stanici, glikoliza. Prestankom naglog rasta i razvoja odnosno ulaskom u odraslo doba, glavni način dobivanja ATP-a postaje oksidativna fosforilacija. Daljnjim starenjem smanjuje se funkcija mitohondrija i ponovno glikoliza postaje primarni izvor ATP-a. Koncentracije karnozina u stanicama mišića djece do 5 godina niske su, onda se povećavaju do njihove stalne koncentracije u stanicama odraslih osoba. Veza između koncentracije karnozina i metaboličkih stanja nije sasvim jasna, no njegova velika koncentracija u tkivima koja obavljaju glikolizu može biti objašnjena na temelju njegovih puferskih svojstava jer se u tkivima koja obavljaju glikolizu generiraju velike količine hidrona. Osim toga, karnozin reagira s potencijalno štetnim nusproduktima glikolize. Svojom antioksidativnom funkcijom od štete uzrokovane starenjem štiti makromolekule, kao proteine, nukleinske kiseline i lipide. Istraživanje koje je provedeno na miševima pokazalo je da je starenje usporeno i životni vijek produljen za 20 % kada im je dan suplementarni karnozin.<sup>14</sup>

#### 2.3.1. Karnozin i razvoj raka

Usprkos njegovom „anti-age“ djelovanju, odnosno njegovom usporavanju starenja stanice, pokazalo se *in vitro* da ima antitumorsko djelovanje odnosno da inhibira rast stanica raka. Nastanak produkata glikacije koji nastaju ubrzano tijekom starenja i imaju ulogu u razvoju raka sprječava karnozin. Direktna način djelovanja karnozina i produkata glikacije, kao i njihovog signalnog puta u razvoju tumora još nije poznat, no pruža nove prilike za istraživanja karnozina i njegove antitumorske funkcije.<sup>14</sup>

#### 2.3.2. Primjena u medicini i farmaciji

Istraživanja su pokazala da karnozin ima neuroprotektivni učinak i može se koristiti za liječenje neurodegenerativnih bolesti koje se javljaju starenjem, kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest, kao i vaskularni tip demencije, prionske bolesti i poremećaje iz spektra autizma.<sup>3,4,14</sup> Osim neurodegenerativnih bolesti, primjenjuje se za liječenje čireva na želucu<sup>10,11</sup>, kao i bolesti koje nastaju zbog oksidativnog stresa čega su primjer ateroskleroza i dijabetes.<sup>2</sup>

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest i najčešći uzrok demencije kod starijih osoba. Karakterizira ju progresivno pogoršanje kognicije. Jedan od predloženih mehanizama djelovanja bolesti je nakupljanje  $\beta$ -amiloidnog proteina u mozgu. Pokazalo se da bi karnozin mogao biti učinkovit u sprječavanju nakupljanja  $\beta$ -amiloida u mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolešću. Kod miševa se pokazalo da karnozin potiskuje smanjenu funkcionalnost mitohondrija i aktivira ugljičnu anhidrazu koja katalizira reakciju ugljikovog(IV) oksida i vode koja je ključna u procesu staničnog disanja, a kod pacijenata Alzheimerove bolesti ima smanjeno djelovanje.<sup>14</sup> Pokazala se manja koncentracija reaktivnih aldehida kod miševa kojima je davan suplementarni karnozin. Reaktivni karbonilni spojevi uzrokuju unakrsno povezivanje proteina i nastajanje agregata koji se akumuliraju u stanicama. Karnozin stvara adukte s reaktivnim karbonilnim spojevima i tako sprječava njihovu reakciju s proteinima i peptidima u stanici.<sup>6</sup>

Parkinsonova bolest je neurodegenerativna bolest koja se također kao i Alzheimerova bolest, javlja kao posljedica starenja. Karakterizirana je rigidnošću tijela, usporenim kretanjem i tremorima.<sup>6</sup> *Substantia nigra* dio je mozga podložan promjenama kod Parkinsonove bolesti. Otkriveno je da je koncentracija citosolne karnozinaze kod oboljelih osoba triput veća u tom dijelu mozga od uobičajene. Karnozin koji potencijalno ima zaštitnu ulogu u tom dijelu mozga, ima manju koncentraciju i time manju zaštitnu moć.

Kod pacijenata dijabetesa tipa 2 mogu se javiti bolesti kao ateroskleroza, upala bubrega i katarakt kao posljedica djelovanja reaktivnih karbonilnih vrsta na proteine. Zbog svoje zaštitne uloge prema proteinima karnozin je istraživao kao potencijalni lijek za komplikacije dijabetesa tipa 2. Pokazalo se da je bol uzrokovana dijabetesom posljedica reaktivnih karbonilnih vrsta i da karnozin može smanjiti bol kod miševa.<sup>14</sup>

Polaprezinc je lijek koji se koristi za liječenje čireva na želucu. Za njegovo djelovanje većinom je zaslužan cink odnosno cinkov ion, no pretpostavka je da karnozin služi kao neka vrsta transportera do rane na želucu.<sup>10</sup> Primjena kompleksa cinka i karnozina na rane zbog pritiska to jest na dekubitus pacijenata pokazala je velik potencijal liječenja i takvih vrsta rana derivatom karnozina.<sup>11</sup>

### 2.3.3. Primjena u kozmetici

Kozmetika je u sve široj primjeni u današnjem svijetu, a karnozin se pokazao kao dobar sastojak u kozmetičkim proizvodima zbog svojeg „anti-age“ djelovanja. Provedeno je istraživanje u kojoj su sudionici uzimali oralne suplemente karnozina i utvrđeno je da su nakon tri mjeseca

korištenja, i jednog mjeseca pauze, vidljivi učinci karnozina na koži u odnosu na *placebo*, bez pojave nuspojava. Poboľšan je izgled kože sudionika, kao i smanjena pojava finih linija.<sup>15</sup>

#### 2.3.4. Primjena u nutricionizmu

Pokazalo se da uzimanje suplemenata  $\beta$ -alanina poboljšava mišićnu performansu zbog povećanja koncentracije karnozina u skeletnim mišićima. Karnozin, kao što je prethodno opisano, ima ulogu pufera i sprječava zakiseljavanje mišića, čime se smanjuje zamor mišića.<sup>9</sup>

#### 2.3.5. Metaloorganske mreže karnozina i cinka(II)

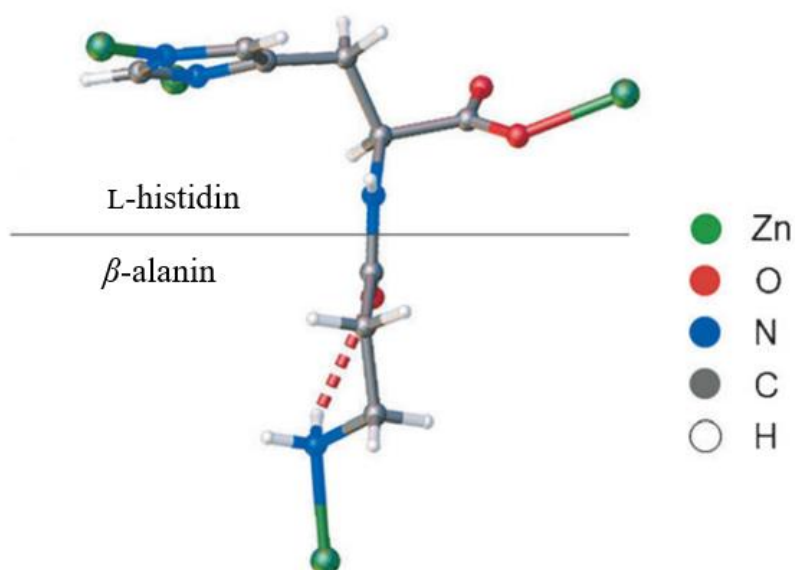
Primjer primjene karnozina u nanotehnologiji su MOF (*metal-organic framework*) spojevi s karnozinom. Takvi spojevi su nanomaterijali koji imaju primjenu u skladištenju ili razdvajanju plinova, tekućina i elektrokemijske energije.<sup>16</sup>

MOF su kristalni porozni materijali koji se sastoje od anorganskih čvorova koje čine ioni ili klasteri iona koji su povezani organskim spojevima koordinacijskom vezom.<sup>17</sup> Njihova porozna struktura koja stvara „kavez“ za druge molekule ima veoma veliku specifičnu površinu.<sup>16</sup> Kao organske molekule poveznice korištene su aminokiseline, peptidi, nukleinske baze i ugljikohidrati.<sup>17</sup> Zbog njihove specifične strukture, zamjenom iona metala ili organske tvari mijenja se veličina pora i oni mogu vezati određene male molekule, najčešće u plinovitom stanju.<sup>16</sup>

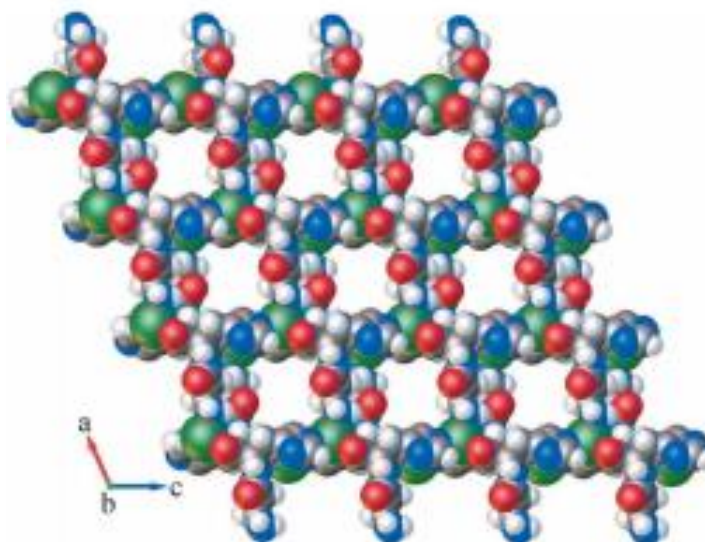
Karnozin je upotrijebljen kao poveznica između cinkovih(II) iona u jednom takvom MOF, ZnCar·DMF. Peptidni lanac karnozina ima dodatnu metilensku (-CH<sub>2</sub>-) skupinu zbog  $\beta$ -alanina u odnosu na dipeptide esencijalnih aminokiselina.

Uz imidazolnu skupinu histidina i dodatnu metilensku skupinu karnozin ima dva potencijalna mjesta povezivanja u odnosu na druge dipeptide, kao na primjer Gly-Ala ili Gly-Thr. ZnCar·DMF je trodimenzionalni MOF spoj u kojem je svaka molekula karnozina koordinativno vezana za četiri tetraedarski kooordinirana cinkova(II) kationa, od kojih su dva povezana deprotoniranim histidinom (slika 6).

Spoj ima jak afinitet prema vezanju malih molekula kao ugljikova(IV) oksida i metana. Fleksibilnost materijala proizlazi iz vodikovih veza koje stvaraju molekule gosta i dipeptid zbog čega je karnozin u različitim konformacijama koje se razlikuju u torzijskim kutevima.<sup>17</sup> Osim karnozina ispituju se karnozinu slični derivati kao organske molekule poveznice.



Slika 6. Koordinacija molekule L-karnozina s četiri cinkova Zn(II) iona prikazana modelom štapića i kuglica. Iznad linije prikazana je koordinacija L-histidina s tri cinkova iona, a ispod linije prikazana je koordinacija β-alanina s jednim cinkovim ionom. Iscrtana linija prikazuje vodikovu vezu između karbonilnog kisikovog iona peptidne veze i amino-dušikovog iona β-alanina (slika je preuzeta iz literaturnog izvora 17).



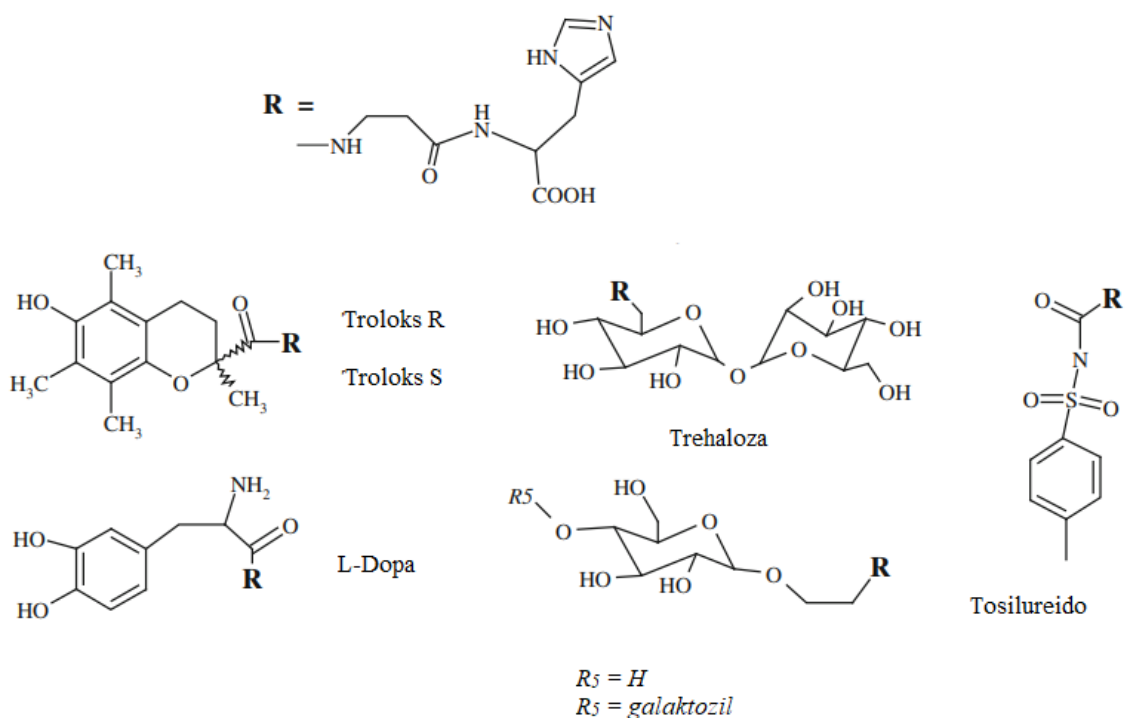
Slika 7. Prikaz metaloorganske mreže ZnCar·DMF duž osi *b* tako da su vidljive jednodimenzionalne pore (slika je preuzeta iz literaturnog izvora 17).

## 2.4. Derivati karnozina

Zbog njegovih svojstava, ali i podložnosti hidrolizi karnozinazama, derivati karnozina postali su važan objekt istraživanja. Podložnost razgradnji ograničava upotrebu karnozina za liječenje. Najjednostavniji derivat karnozina je *N*-acetilkarnozin, prolijek karnozina, koji je prirodno prisutan u organizmu i djelomično je rezistentan na hidrolizu karnozinazama. Osim *N*-acetilkarnozina, kao jedno od mogućih rješenja ispitivao se enantiomer D-karnozin ( $\beta$ -alanil-D-histidin) koji se ne razgrađuje karnozinazama, dok pokazuje jednaku aktivnost kao L-karnozin. Otkriveno je da je D-karnozin manje biološki dostupan jer ga ne prepoznaje hPepT1, transporter koji pronalazi i prenosi peptide male molekulske mase u debelom crijevu. Pokušaji u pronalasku načina da se poveća dostupnost D-karnozina doveli su do proizvodnje novih spojeva. Osim D-karnozina, u pokušaju unaprjeđenja upotrebe karnozina, sintetizirani su razni derivati koji se mogu svrstati u nekoliko skupina.<sup>5,18</sup>

### 2.4.1. Derivati na amino-skupini

Prednost derivata na amino-skupini polazi iz toga što ih prepoznaje transporter hPepT1 jer amino-skupina nije esencijalna za prepoznavanje peptida. Ovakvi derivati nemaju mogućnost reagiranja s reaktivnim karbonilnim vrstama jer im je zamijenjena amino-skupina koja je nužna za takve reakcije. Ideja o zamjeni amino-skupine dolazi iz želje za očuvanjem antioksidativne funkcije i sprječavanjem već spomenute hidrolize dipeptida. Neki od mogućih supstituenata su troloks, L-DOPA, vitamini, ciklodekstrini i neki šećeri kao laktoza, trehaloza i glukoza (slika 8). Najčešći način dobivanja tih derivata je aciliranje karnozina supstituiranog tosilatom, jodidom ili bromidom željenom skupinom u reakcijama nukleofilne supstitucije.



Slika 8. Neki od derivata karnozina na amino-skupini uz molekulu karnozina označenu kao skupina **R** (slika je prilagođena i preuzeta iz literaturnog izvora 18).

Utvrđeno je da derivati s (*R*)-troloksom (slika 8) i (*S*)-troloksom (slika 8) (eng. *Trolox*, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), u vodi topljivim analogom vitamina E, koji pronalazi reaktivne kisikove spojeve i služi kao antioksidans, pokazuju prosječnu aktivnost između troloksa i karnozina. Njihovo antioksidativno djelovanje testirano je na nekoliko načina (hemoliza, DPPH metoda, oksidacija lipoproteina). Utvrđeno je da postoji stereoselektivnost te bolju antioksidativnu aktivnost pokazuje derivat L-karnozina s (*R*)-troloksom od onoga s (*S*)-troloksom.

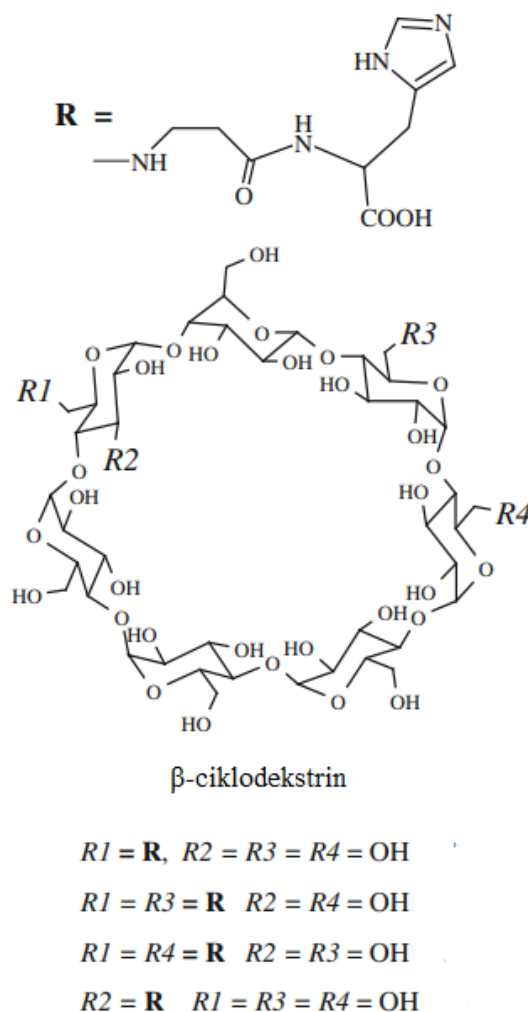
Sintetiziran je i derivat s L-DOPA-om (L-3,4-dihidroksifenilalanin, levodopom), prolijekom za liječenje Parkinsonove bolesti, kako bi se antioksidativnom funkcijom karnozina smanjio udio reaktivnih kisikovih vrsta koje uobičajeno nastaju prilikom liječenja bolesti s L-DOPA-om. Pokazano je smanjeno otpuštanje L-DOPA i nije primijećena značajna antioksidativna aktivnost.

S vitaminom E složenim sintetičkim postupkom dobiven je derivat čija je glavna funkcija transport karnozina do različitih tkiva.



Dijastereomeri derivata s (*R*) i (*S*)- $\alpha$ -lipoičnom kiselinom izolirani su, no analizirana je samo njihova smjesa koja pokazuje dobru antioksidativnu aktivnost. Osim toga pokazuje antihiperalgezično djelovanje (djelovanje protiv hiperalgezije koja je izražena velikom osjetljivošću na bol) *in vivo* koje ne pokazuju ni L-karnozin, ni  $\alpha$ -lipoična kiselina.

Sintetizirano je više vrsta glikokonjugata karnozina. Jedan od njih je  $\beta$ -ciklodekstrin, koji se s karnozinom može vezati na više mjesta (slika 9), preko –OH skupina šećera.



Slika 9. Derivati karnozina s  $\beta$ -ciklodekstrinom uz označenu molekulu karnozina kao skupinu R (slika je prilagođena i preuzeta iz literaturnog izvora 18).

Ciklodekstrini se u farmaciji koriste jer imaju svojstvo inkluzije lijekova ili služe za njihovu stabilizaciju. Derivati pokazuju smanjenu razgradnju karnozina kao i poboljšanje antioksidativne aktivnosti u odnosu na prirodni L-karnozin. Također kod derivata s  $\beta$ -ciklodekstrinom i  $\beta$ -monoaltrociklodekstrinom pokazuju prevenciju oksidacije lipoproteina

koja kreće pri koncentracijama nakrovihi(II) iona koje su 10-20 puta manje od koncentracije L-karnozina.

Trehaloza je disaharid građen od 2 molekule D-glukoze povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom. Derivat karnozina kojemu je amino-skupina zamijenjena trehalozom pokazuje svojstva karnozina i trehaloze. Uz to pokazuje povećanje u antioksidativnom djelovanju i štiti derivat od hidrolize karnozinazom. Derivati s glukozom i fruktozom su sintetizirani kako bi povećali biološku dostupnost karnozina. Neki životinjski lektini pokazali su se kao mogući medijatori upalnog procesa čija je glavna uloga pronalazak određenih šećera. U tu svrhu se sintetiziraju glikokonjugati malih molekula ili proteina koji se specifično vežu za određeni lektin. Takvi derivati karnozina su stabilni u prisutnosti karnozinaza.

Biotin ili vitamin H derivati kao i 4-toluensulfonilureido derivati su sintetizirani i pokazuju rezistenciju na hidrolizu karnozinazama. Potonji su istraživani zbog njihovog djelovanja protiv stanica raka na način da inhibiraju ugljičnu anhidrazu koja je ključna u procesu staničnog disanja. Njihovu primjenu isključuje nedovoljno efektivan transepitelni prijenos.<sup>5,18</sup>

#### 2.4.2. Derivati na karboksilnoj skupini

Karboksilna skupina karnozina modificira se tako da nastane ester ili amid od kojih je najjednostavniji primarni amid karnozina. Najčešća metoda dobivanja amida karnozina je reakcija kondenzacija amina i karboksilne kiseline odnosno u slučaju karnozina karboksilne skupine  $\beta$ -alanina zaštićenog *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc) i histidin amida uz aktivirajuće reagense kao HOBt (hidroksibenzotriazol) ili DCC (*N,N*-dicikloheksilkarbodiimid). U nekim slučajevima je i neprotonirani histidinski dušikov atom zaštićen nekom zaštitnom skupinom. Stvaranje amidne veze nudi prednost jer dolazi do velikog povećanja rezistencije prema hidrolizi serumskom karnozinazom iako su važne funkcije dipeptida sačuvane. Do povećanja u rezistenciji dolazi zbog toga što je modificirana karboksilna skupina koja je ključna za prepoznavanje karnozina, a antiglikacijska funkcija je omogućena dok je amino-skupina nepromijenjena. Glikacija je vezanje anomernog ugljika šećera na funkcionalnu skupinu proteina ili lipida bez enzimske katalize i reakcija je koja se odvija kod fizioloških (starenje) i patofizioloških (dijabetes, ateroskleroza i druge bolesti) procesa.<sup>5,18</sup>

#### 2.4.3. Derivati D-karnozina

Kako transporter hPepT1 dobro ne prepoznaje D-karnozin sintetizirani su i derivati D-karnozina s ciljem da mu se poveća dostupnost i apsorpcija u crijevima. Sintetizirani su derivati i na

amino- i na karboksilnoj skupini te je istraživana njihova hidroliza u krvnom serumu miševa. Proučeni su razni učinci uključujući smanjenje štete uzrokovane reaktivnim karbonilnim skupinama, kao što su krajnji produkti glikacije i hiperlipidemije te prevencija ozljeda bubrega i krvnih žila.

Osim toga sintetizirani su kako bi se usporedila stereokemija derivata s L- i D-karnozinom. Spojevi s ciklodekstrinom i trehalozom pokazali su kako je kiralnost histidina važna za kelatiranje metala.<sup>5,18</sup>

#### 2.4.4. Koordinacijski spojevi derivata karnozina

Najviše je istraživani kompleks bakra(II) s L-karnozinom zbog njegove stabilnosti. Osim samog L-karnozina, istraživani su i metalni kompleksi njegovih derivata. Prvi su istraživani koordinacijski spojevi bakra(II) i ciklodekstrinskih derivata karnozina koji pokazuju vezanje slično onom samog L-karnozina unatoč steričkim smetnjama. Termodinamička stabilnost i stehiometrija također su usporedive s kompleksom prirodnog L-karnozina. Kompleks L-karnozina s bakrovim(II) ionima pokazuje enzimsku aktivnost superoksidne dismutaze. Jednaku enzimsku aktivnost pokazuju i ciklodekstrinski derivati L-karnozina.

Također su pronađeni bakrovi(II) kompleksi ciklodekstrinskih i trehaloznih derivata D-karnozina. Stabilnost njihovih dimernih oblika manja je od stabilnosti analoga s L-karnozinom.

Za esterske i amidne derivate L-karnozina također su utvrđeni kompleksi s bakrovim(II) ionima slični onima samog karnozina. Samo amidi, i to u deprotoniranom obliku mogu tvoriti dimerni kompleks s ionima bakra(II) dok esteri ne mogu zbog nedostatka karboksilata, u čemu se razlikuju od samog karnozina.<sup>5,18</sup>

## 2.5. Pogled u budućnost

Budućnost istraživanja s karnozinom i njegovim derivatima je dalekosežna i obećavajuća. Uz nejasnu biološku ulogu, mnogo toga o ovom dipeptidu još je nepoznato. Rezultati na sadašnjim istraživanjima pokazuju pozitivne rezultate o raznim potencijalnim koristima karnozina. Samo u tekućoj 2021. godini izdano je preko 200 članaka na temu karnozina, što pokazuje interes znanstvenika za ovaj dipeptid.<sup>19</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. V. Lanza, F. Bellia, R. D'Agata, G. Grasso, E. Rizzarelli, G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 181–188.
2. A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave, *Physiol. Rev.* **93** (2013) 1803–1845.
3. O. Shemchuk, *Optimizing Physicochemical Properties of Natural Antioxidants and Geroprotectors: L-Carnosine and Melatonin*, Disertacija, Sveučilište u Bologni, 2015
4. M. Kawahara, K. Tanaka, M. Kato-Negishi, *Nutrients* **10** (2018) 1–20.
5. V. R. Preedy, *Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2015, str. 46–47, 83–98.
6. J. H. Cararo, E. L. Streck, P. F. Schuck, G. da C Ferreira, *Aging. Dis.* **6** (2015) 369–379.
7. E. J. Baran, *Biochemistry (Moscow)* **65** (2000) 789–797.
8. M. Jozanović, N. Sakač, D. Jakobović, M. Sak-Bosnar, *Int. J. Electrochem. Sci.* **10** (2015) 5787–5799.
9. J. Y. Culbertson, R. B. Kreider, M. Greenwood, M. Cooke, *Nutrients* **2** (2010) 75–98.
10. T. Matsukura, H. Tanaka, *Biochemistry (Moscow)* **65** (2000) 817–823.
11. K. Sakae, H. Yanagisawa, *Biomed. Res. Trace Elem.* **25** (2014) 106–118.
12. K. Štakić, *Priprava i karakterizacija koordinacijskih spojeva nekih esencijalnih metala s karnozinom i odabranim organskim kiselinama*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021, str. 14–16
13. J. C. Calderón, P. Bolaños, C. Caputo, *Biophys. Rev.* **6** (2014) 133–160.
14. A. R. Hipkiss, S. P. Cartwright, C. Bromley, S. R. Gross, R. M. Bill, *Chem. Cent. J.* **7** (2013) 213–217.
15. M. A. Babizhayev, A. I. Deyev, E. L. Savel'yeva, V. Z. Lankin, Y. E. Yegorov, *J. Dermatol. Treat.* **23** (2014) 345–384.
16. <https://www.nanowerk.com/mof-metal-organic-framework.php> (datum pristupa 31. kolovoza 2020.)
17. A. P. Katsoulidis, K. Park, D. Antypov, C. Mart-Gastaldo, G. J. Miller, J. E. Warren, C. M. Robertson, F. Blanc, G. R. Darling, N. G. Berry, J. A. Purton, D. J. Adams, M. J. Rosseinsky, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **53** (2014) 193–198.
18. F. Bellia, G. Vecchio, E. Rizzarelli, *Amino Acids* **43** (2012) 153–163.

19. [https://scholar.google.com/scholar?hl=hr&as\\_sdt=0,5&q=carnosine&scisbd=1](https://scholar.google.com/scholar?hl=hr&as_sdt=0,5&q=carnosine&scisbd=1) (datum pristupa 29. lipnja 2021.)