

Received: 2012.01.24  
Accepted: 2012.03.26  
Published: 2012.04.20

## Karnozyna i karnozynaza a choroby nerek

### Carnosine, carnosinase and kidney diseases

Katarzyna Kiliś-Pstrusińska

Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej Akademii Medycznej we Wrocławiu

#### Streszczenie

Karnozyna (beta-alanylo-L-histydyna) jest dwupeptydem, występującym w organizmie człowieka w różnych tkankach, m.in. w nerkach. Jest rozkładana w wyniku hydrolizy przez enzym karnozynazę. Wyróżnia się jej dwa izoenzymy: sekrecyjną surowiczą karnozynazę i cytosoliczną nieswoistą dipeptydazę, kodowane odpowiednio przez geny *CNDP1* i *CNDP2*, zlokalizowane na chromosomie 18q22.3. Karnozyna hamuje powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek, wolnych rodników tlenowych, a także syntezę kolagenu VI i fibronektyny przez podocyty i komórki mezangialne w nerkach. Jest naturalnym inhibitorem enzymu konwertującego angiotensynę. Utrzymuje równowagę kwasowo-zasadową w tkankach i zmniejsza toksyczność jonów metali. W badaniach eksperymentalnych wykazano ponadto, że redukuje poziom prozapalnych i profibrotycznych cytokin. Dwupeptyd ten uważany jest za naturalną substancję hamującą procesy starzenia się ludzi o dobroczynnym wpływie na układ sercowo-naczyniowy. W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących roli karnozyny w chorobach nerek, zwłaszcza w ostrej niewydolności nerek w przebiegu ich niedokrwienia/reperfuzji, w nefropatii cukrzycowej, w nefrotoksyczności indukowanej gentamycyną oraz w regulacji ciśnienia tętniczego. Przeanalizowano zależności pomiędzy karnozyną a karnozynazą i polimorfizmami kodującymi ją genów. Omówiono znaczenie polimorfizmu genu *CNDP1* w rozwoju nefropatii cukrzycowej i przewlekłej choroby nerek o niecukrzycowej etiologii. Ze względu na zaangażowanie karnozyny w liczne szlaki metaboliczne uczestniczące w patofizjologii uszkodzenia nerek, a także jej nefroprotekcyjny charakter, karnozyna może mieć istotne znaczenie terapeutyczne. Istnieje potrzeba dalszych badań nad metabolizmem tego dwupeptydu i jego biologicznymi właściwościami, zwłaszcza w odniesieniu do ludzkiego organizmu.

#### Słowa kluczowe:

karnozyna • karnozynazy • gen *CNDP1* • choroby nerek

#### Summary

Carnosine (beta-alanyl-L-histidine) is an endogenously synthesized dipeptide which is present in different human tissues, including the kidney. Carnosine is hydrolyzed by the enzyme carnosinase. There are two carnosinase homologues: serum secreted carnosinase and non-specific cytosolic dipeptidase, encoded by the genes *CNDP1* and *CNDP2* respectively and located on chromosome 18q22.3. Carnosine functions as a radical oxygen species scavenger and as a natural angiotensin converting enzyme inhibitor. Carnosine inhibits advanced glycation end product formation and reduces the synthesis of matrix proteins such as fibronectin and collagen type VI of podocytes and mesangial cells. In experimental studies it was shown that carnosine reduces the level of proinflammatory and profibrotic cytokines. It is suggested that carnosine is a naturally occurring anti-aging substance in human organisms with a beneficial effect on the cardiovascular system.

This paper reports the results of studies concerning carnosine's role in kidney diseases, particularly in ischemia/reperfusion induced acute renal failure, diabetic nephropathy, gentamicin-induced nephrotoxicity and also in blood pressure regulation. The correlations between serum carnosine and serum carnosinase activity and polymorphism in the *CNDP1* gene are analyzed. The

role of *CNDP1* gene polymorphism in the development of diabetic nephropathy and non-diabetic chronic kidney disease is discussed. Carnosine is engaged in different metabolic pathways. It has nephroprotective features. Further studies of carnosine metabolism and its biological properties, particularly those concerning the human organism, are required.

**Key words:** carnosine • carnosinases • gene *CNDP1* • kidney diseases

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=991600>

**Word count:** 2945

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 57

**Adres autorki:** dr hab. Katarzyna Kiliś-Pstrusińska, prof. nadzw. Katedra i Klinika Nefrologii Pediatrycznej AM we Wrocławiu, 50-556 Wrocław, ul. Borowska 213; e-mail: katarzyna.kilis-pstrusinska@am.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **ACE** – konwertaza angiotensyny (angiotensin converting enzyme); **AGEs** – produkty zaawansowanej glikacji białek (advanced glycation end products); **ATP** – adenozyntotrójfosforan; **ESRD** – schyłkowa niewydolność nerek (end stage renal disease); **IL** – interleukina; **PChN** – przewlekła choroba nerek.

## WPROWADZENIE

Karnozyna (beta-alanylo-L-histydyna) jest dwupeptydem, występującym w organizmie człowieka w różnych tkankach i narządach, m.in. w mięśniach szkieletowych, nerkach, żołądku, wątrobie i w ośrodkowym układzie nerwowym [29]. Jest syntetyzowana z L-histydyny i beta-alaniny w reakcji katalizowanej przez syntetazę karnozynową z udziałem adenozyntotrójfosforanu (ATP) [34,41]. Karnozyna jest rozkładana za pośrednictwem hydrolizy przez enzym karnozynazę na beta-alaninę i L-histydynę. Karnozynaza (dipeptydaza aminoacylohistydylowa), należąca do rodziny metaloproteaz (M20), występuje w organizmie człowieka w postaci dwóch izoenzymów: sekrecyjnej surowiczej karnozynazy (EC 3.4.13.20) o masie cząsteczkowej 167 kDa i tkankowej karnozynazy (EC 3.4.13.18), obecnie nazywanej cytozoliczną nieswoistą dipeptydazą, o masie cząsteczkowej 90 kDa [53]. Izoenzymy te są kodowane odpowiednio przez geny *CNDP1* i *CNDP2*, umiejscowione na chromosomie 18 (18q22.3) [53].

Karnozyna i jej metabolity mogą podlegać dalszym przemianom [6,15,29]. W wyniku metylacji karnozyny powstaje anseryna lub ophidyna. Z kolei produktem dekarboksylacji histydyny jest histamina – mediator reakcji alergicznych i zapalnych. Beta-alanina stanowi niezbędny element koenzymu A, może także stymulować syntezę kolagenu w tkankach [36]. Karnozyna w surowicy jest natychmiast metabolizowana, stąd jej stężenie w tym płynie ustrojowym jest bardzo niskie [15,24,39]. Wrodzony niedobór osoczowej karnozynazy prowadzi do rozwoju choroby dziedzicznej autosomalnie recesywnie, objawiającej się opóźnieniem umysłowym i wiąże się z występowaniem karnozynurii [34]. Wyższe stężenia karnozyny opisano w komórkach mięśni szkieletowych, serca i mózgu. Jej poziom był zależny m.in. od aktywności tkankowej karnozynazy [6,53]. Bardzo wysokie wewnątrzkomórkowe stężenia karnozyny odnotowano tylko przy braku enzymu katalizującego jej hydrolizę [15]. Uważa się także, że stężenie karnozyny w tkankach

w pewnym stopniu zależy od pożywienia. W badaniach na szczurach wykazano, że dieta bogata w histydyne zwiększa stężenie karnozyny w mięśniach szkieletowych [49]. Z kolei suplementacja egzogenenną karnozyną powoduje wzrost jej zawartości w szkielecie szczurów, natomiast nie prowadzi do zwiększenia stężenia w sercu, wątrobie czy mięśniach poprzecznie prążkowanych [8]. Stwierdzono, że już w czasie jelitowej absorpcji karnozyny, zarówno u ludzi, jak i zwierząt, dochodzi do jej częściowej hydrolizy do L-histydyny i beta-alaniny [14,50].

Karnozyna hamuje powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGEs - advanced glycation end products), wolnych rodników tlenowych, autokrynyne wytwarzanie angiotensyny II i syntezę fibronektyny [5,16,20,21]. Utrzymuje równowagę kwasowo-zasadową w tkankach, zmniejsza toksyczność jonów metali i reguluje aktywność retikularnych kanałów wapniowych, m.in. w kardiomiocytach [5,44]. Dwupeptyd ten uważany jest za naturalną substancję hamującą procesy starzenia się ludzi, o dobroczynnym wpływie na układ sercowo-naczyniowy [5,18,19,44]. W badaniach eksperymentalnych wykazano ponadto, że karnozyna redukuje poziom prozapalnych i profibrotycznych cytokin, wśród nich transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF-beta1 – transforming growth factor-beta type 1) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa – tumor necrosis factor-alpha) [10,23].

Z powyższego wynika, że karnozyna zaangażowana jest w szlaki metaboliczne, mogące uczestniczyć w patofizjologii uszkodzenia nerek, a właściwości biologiczne dwupeptydu sugerują jego nefroprotektoryjne działanie. Doniesienia na ten temat w piśmiennictwie są jednak nieliczne, podobnie jak prace dotyczące karnozynazy.

## AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA KARNOZYNY

Karnozyna działa antyoksydacyjnie. Unieczynnia rodniki hydroksylowe i nadtlenkowe, jest silnym „wymiataczem”

tlenu singletowego [5,16,17,41]. Ze względu na swoje hydrofilne właściwości uzupełnia cytosolową frakcję bariery antyoksydacyjnej i jest traktowana jako rozpuszczalny w wodzie odpowiednik lipofilnych antyoksydantów, np. alfa-tokoferolu [15,49]. U zwierząt doświadczalnych wykazano, że łączna suplementacja karnozyną i alfa-tokoferolem bardziej zwiększa stężenie obydwu związków w tkankach, aniżeli podanie samego alfa-tokoferolu, co sugeruje ich synergistyczne działanie [8]. Alfa-tokoferol jako przeciwutleniacz był wielokrotnie badany w różnych schorzeniach nerek. Między innymi u chorych hemodializowanych wykazano, że obniża stres oksydacyjny i może chronić przed wtórnymi schorzeniami układu sercowo-naczyniowego [9]. Dodatkowo podanie karnozyny być może spotęgowałoby to korzystne działanie. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono także, że karnozyna obniża stężenie dialdehydu malonylowego, wskaźnika peroksydacji lipidów, w sposób zależny od dawki [22].

Karnozyna wykazuje właściwości buforujące, co ma szczególnie znaczenie w tkankach, w których łatwo dochodzi do zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej [6,15]. Zawarte w cząsteczce dwupeptydu atomy azotu w imidazolowym pierścieniu histydyny mogą ulegać reakcji protonowania w miarę zakwaszania wewnątrzkomórkowego środowiska. W słabo alkalicznym pH karnozyna osłabia peroksydację lipidów. Wiąże metale ciężkie (cynk, kobalt, miedź), przez co hamuje wiele reakcji enzymatycznych [5]. W ten sposób może dochodzić do regulowania stężenia metali w tkankach i zmniejszenia ich toksyczności.

Karnozyna jest uważana za modulator odpowiedzi immunologicznej w ludzkich neutrofilach, w których zwiększa wytwarzanie interleukiny 1 beta (IL-1 beta) oraz hamuje procesy apoptozy [51].

Karnozyna odgrywa istotną rolę w regulacji stresu karbonylowego. Wiąże reaktywne aldehydy, toksyczne dla komórek ze względu na przyłączanie się ich do białek i lipoprotein [1,6,15,17,19]. Może także wchodzić w reakcje z grupami karbonyłowymi już zmodyfikowanych oksydacyjnie białek. Ułatwia proces ich ubikwitynacji, stymuluje aktywność degradacyjną proteasomów, przez co przyczynia się do utylizacji karbonylowanych białek, których gromadzenie się w komórkach prowadzi do ich starzenia i śmierci.

McFarland i Holliday wykazali, że dodanie karnozyny do hodowli ludzkich fibroblastów wydłuża życie komórek (opóźnienie objawów starzenia się, zwiększenie liczby zaprogramowanych podziałów komórkowych) [33]. Efekt ten może wynikać z hamowania przez karnozynę skracania telomerowych odcinków DNA [45]. Z kolei w badaniach Sona i wsp. stwierdzono, że karnozyna uniemożliwia translację mRNA dla IL-8 poprzez blokowanie fosforylacji czynnika inicjującego eIF4E w aktywowanych komórkach nabłonka jelitowego i komórkach Caco2 [48]. W rezultacie synteza tej prozapalnej cytokiny ulega zmniejszeniu. Wykazano także, że karnozyna może blokować inne białka regulatorowe, takie jak kinazy ERK1/2 i p38MAP. W badaniach prowadzonych na *Caenorhabditis elegans*, modelowym organizmie w genetyce, wykazano, że u osobników z mutacją czynnika eIF4E, inicjującego translację mRNA, starzenie jest opóźnione, odporność na stres zwiększona, a okres życia ulega wydłużeniu [38]. Zdaniem Hipkissa,

korzystny wpływ karnozyny na przeżycie ludzkich fibroblastów może się dokonywać poprzez analogiczne mechanizmy [18].

#### KARNOZYNA A CHOROBY NEREK

Karnozyna, dzięki swojej biologicznej aktywności przedstawionej powyżej, może blokować patologiczne procesy w nerkach i hamować rozwój chorób tego narządu.

Niektórzy autorzy uważają, że dwupeptyd ten pośredniczy w regulacji ciśnienia tętniczego, w której dominującą rolę odgrywają nerki [23,26,37,57]. Zdaniem Hou i wsp. karnozyna ma właściwości naturalnego inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę (ACE – angiotensin converting enzyme) [23]. Willi i wsp. opisali przypadek dziecka z hipotensją i podwyższonym surowiczym stężeniem karnozyny z powodu wrodzonego niedoboru karnozynazy [57]. W badaniach Nijijima i wsp. wykazano, że u szczurów z nadciśnieniem tętniczym indukowanym octanem dekokortykosteronu (DOCA) i sodem, stosowanie diety bogatej w karnozynę powodowało obniżenie wartości ciśnienia [37]. Inni autorzy, również u szczurów z nadciśnieniem wywołanym jak wyżej, stwierdzili niskie stężenie karnozyny w mięśniach poprzecznie prążkowanych [26]. W badaniach Tanidy i wsp. zaobserwowano, że u szczurów znieczulonych uretanem, dożylnie podanie L-karnozyny powodowało w nerkach zmniejszenie aktywności układu współczulnego, będącego jednym z czynników patogenetycznych nadciśnienia tętniczego [52]. Działanie hipotensyjne karnozyny i przewodnictwo w pozawojowych włóknach sympatycznych, unerwiających nerkowe łożysko naczyniowe, zależało od dawki peptydu. Według autorów tej pracy w działaniu hipotensyjnym karnozyny pośredniczy histamina, jako produkt jej metabolizmu oraz neurony histaminergiczne w jądrze nadskrzyżowaniowym podwzgórza.

Badacze japońscy ocenili efekt renoprotekcyjny L-karnozyny u szczurów z ostrą niewydolnością nerek w przebiegu niedokrwienia/reperfuzji [11,12,28]. Molekularne mechanizmy leżące u podłoża tego typu uszkodzenia nerek nie są do końca jasne. Wśród czynników przyczynowych wymieniane są m.in. zmniejszenie ATP, reaktywne formy tlenu, aktywacja fosfolipazy i peptydy wazoaktywne. Podnoszone jest także wzmoczenie aktywności układu współczulnego w nerkach, skutkujące zwiększonym uwalnianiem noradrenaliny z zakończeń nerwowych. Przemawia za tym obserwowane u szczurów złagodzenie objawów tej postaci ostrej niewydolności nerek poprzez chirurgiczną lub farmakologiczną blokadę nerwowych włókien współczulnych i w konsekwencji supresję podwyższonego stężenia noradrenaliny w naczyniach żylnych nerek [11]. Podobny efekt zaobserwowano po dożylnym podaniu szczurom L-karnozyny [12]. Zdaniem badaczy nefroprotekcyjne działanie karnozyny w uszkodzeniu nerek wywołanym niedokrwieniem/reperfuzją jest ściśle związane z hamującym wpływem dwupeptydu na aktywność układu współczulnego w nerkach, jakkolwiek możliwy jest także udział antyoksydacyjnych właściwości karnozyny [28]. Korzystne oddziaływanie karnozyny na przebieg ostrego uszkodzenia nerek stwierdzono także podczas jej doustnej suplementacji [13]. U szczurów, którym podawano karnozynę przez 2 tygodnie przed eksperymentalnym niedokrwieniem nerek, obserwowano zmniejszenie stopnia dysfunkcji nerek,

a także histopatologicznych cech uszkodzenia w postaci martwicy cewek, proteinowych wałeczków w cewkach oraz przekrwienia rdzenia. Interesującym jest niewykazanie różnic w surowiczym stężeniu karnozyny w odniesieniu do rodzaju diety (prawidłowa vs. zawierająca karnozynę). W opinii autorów w ochronnym wpływie karnozyny na niedokrwienne uszkodzenie nerek może pośredniczyć histamina i aktywacja receptora H3 w centralnym układzie nerwowym. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań.

Analizowano również wpływ karnozyny na nefrotoksyczność u szczurów indukowaną gentamycyną [47]. Po podaniu antybiotyku w biopatch nerek stwierdzono w kłębuszkach poszerzenie włośniczek z ogniskami martwicy i fragmentację niektórych podocytów, a w cewkach proksymalnych różnego stopnia martwicę. W grupie zwierząt, które jednocześnie otrzymały gentamycynę i karnozynę, odnotowano odbudowę prawidłowej struktury podocytów i cewek proksymalnych oraz istotną poprawę czynności nerek (spadek stężenia kreatyniny o 72%, a mocznika o 33%). Działanie karnozyny, osłabiające polekową nefrotoksyczność Soliman i wsp. tłumaczą właściwościami dwupeptydu: zdolnością do utrzymania płynności błon komórkowych, działaniem buforującym w cytoplazmie, łagodzeniem toksynopochodnego spadku aktywności antyoksydantów: dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i glutationu, a także zdolnością do „zmiatania” wolnych rodników tlenowych, co zapobiega peroksydacji lipidów błon komórkowych oraz do odzyskiwania” tych, które uległy utlenowaniu [47].

Alhamdani i wsp. przeanalizowali wpływ karnozyny na powstawanie AGEs w płynie do dializy otrzewnej (1,5% roztwór dekstrozy, Dianeal PD-2, Baxter, po sterylizacji cieplnej), który inkubowali z ludzką albuminą, kolagenem typu IV, karnozyną, homokarnozyną i anseryną [1]. Wykazali, że karnozyna i pokrewne jej peptydy hamują modyfikację obu białek przez produkty degradacji glukozy, powstające *in vitro* w płynie dializacyjnym wskutek jego sterylizacji [1,2].

Przedmiotem badań pozostaje znaczenie karnozyny w cukrzycy oraz jej powikłaniach. Nefropatia cukrzycowa należy do najczęstszych przyczyn schyłkowej niewydolności nerek w populacji dorosłych. Patomechanizm cukrzycowej choroby nerek nie jest do końca poznany [4]. Z badań klinicznych wynika, iż zasadnicze znaczenie ma hiperglikemia. Uważa się, że istotną rolę we wczesnych stadiach cukrzycy może odgrywać proliferacja komórek mezangium, indukowana przez wysokie stężenia glukozy. Rozpłem komórek mezangialnych pod wpływem różnych bodźców związany jest z akumulacją macierzy i rozwojem stwardnienia kłębuszków nerkowych, co prowadzi do progresji choroby nerek. Janssen i wsp. wykazali, że w hodowli ludzkich podocytów i komórek mezangialnych karnozyna ogranicza indukowane przez glukozę zwiększone wytwarzanie fibronektyny i kolagenu typu VI oraz TGF-beta2 [24]. Z kolei w hodowli szczurzych komórek mezangialnych w wysokich stężeniach glukozy stwierdzono, że karnozyna hamuje ich namnażanie i syntezę DNA w sposób zależny od dawki poprzez wpływ na cykl komórkowy, tj. wzrost populacji komórek w fazie G1 i zmniejszenie liczby komórek w fazie S [25]. Co więcej, odnotowano, że karnozyna obniża aktywność kinaz p-ERK i p-p38, których foforylacja jest

stymulowana przez wysokie stężenia glukozy. Kinazy te odgrywają istotną rolę w kaskadach transdukcji sygnałów do wzrostu komórek i ich innych ważnych funkcji. Wykazano m.in. udział aktywacji kinazy p38 w patogenezie rozplem komórek i kumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej w niedokrwinnym, toksycznym i zapalnym uszkodzeniu nerek oraz w nefropatii cukrzycowej [30,35]. W rozplemie mezangium pod wpływem wysokich stężeń glukozy mają znaczenie również wolne rodniki tlenowe i AGEs. Do toksycznych aldehydów biorących udział w glikacji białek zaliczany jest metyloglioksal [21,30,31]. Sugeruje się, że jest on odpowiedzialny za większość powikłań narządowych cukrzycy [31]. Według Hipkissa karnozyna poprzez wpływ na szlak sygnałowy mTOR blokuje procesy glikolizy i zmniejsza wytwarzanie metyloglioksalu [19]. W tym kontekście ochronny wpływ karnozyny na tkankę nerkową może się dokonywać wielokierunkowo: poprzez blokowanie cyklu komórkowego, w sposób antyoksydacyjny i antyglukacyjny [25,46].

Inni autorzy wskazują, że suplementacja egzogenną karnozyną może chronić przed apoptozą kłębuszków nerkowych w cukrzycy. W modelu doświadczalnym cukrzycy indukowanej streptozotocyną stwierdzono, że podawanie dwupeptydu powoduje odwrócenie zmian wywołanych hiperglikemią [43]. Wykazano zmniejszenie liczby apoptotycznych komórek kłębuszków nerkowych, a także redukcję odsetka utraconych podocytów, mimo podwyższonego poziomu w nerkach szczurów AGEs i zmodyfikowanych białek szlaku heksozaminy (GlcNA). Niezależnie zatem od biochemicznych zaburzeń, działanie ochronne karnozyny na nerki może wynikać z hamowania sygnałów proapoptotycznych.

Przedstawione obserwacje sugerują możliwość zastosowania w przyszłości karnozyny w leczeniu nefropatii cukrzycowej.

## KARNOZYNAZA

W przebiegu schorzeń nerek istotne znaczenie może mieć karnozynaza, rozkładająca karnozynę. Geny kodujące sekrecyjną surowiczą karnozynazę i cytosoliczną nieswoistą dipeptydazę (odpowiednio *CNDPI* i *CNDP2*), są umiejscowione na chromosomie 18q22.3 [53], którego powiązanie z cukrzycową chorobą nerek jest podkreślane w wielu publikacjach [4,24,40]. Gen *CNDPI* składa się z 12 eksonów. Janssen i wsp. badając w 2005 r. polimorfizmy genu *CNDPI* u chorych na cukrzycę w populacji rasy kaukaskiej i u Arabów z Kataru stwierdzili, że najbardziej znacząca jest asocjacja z markerem D18S880 (OR 4,77; 95% CI 1,01–22,5), kodującym trzynukleotydowe (CTG) powtórzenia w eksonie 2 [24]. Polimorfizm ten leży w 5' kodującej części transkryptu, a więc liczba trójnukleotydowych powtórzeń bezpośrednio wpływa na liczbę reszt leucynowych w peptydzie sygnałowym prekursora karnozynazy: 5, 6 lub 7. W dalszej analizie stwierdzono, że najkrótsza forma alleliczna wariantu D18S880, tj. 5 (tzw. *CNDPI Mannheim*) w mniejszym stopniu predysponuje do uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy i jest związana z mniejszą aktywnością karnozynazy w surowicy aniżeli dłuższe formy alleliczne 6 i 7 [24]. Odwrotnie, większa liczba powtórzeń reszt leucyny w peptydzie sygnałowym miałaby usposabiać do rozwoju nefropatii w cukrzycy typu



1 i typu 2. Doniesienia innych autorów są odmienne. Wanic i wsp. wykluczyli polimorfizm genów *CNDP1* i *CNDP2* jako przyczynę nefropatii w cukrzycy typu 1 [56]. Także w populacji Afroamerykanów chorujących na cukrzycę typu 2 wariant D18S880 w genie *CNDP1* nie był związany z nefropatią [32]. Podobne obserwacje odnosiły się do innych wariantów genu *CNDP1* w grupie amerykańskich Hindusów z ESRD w przebiegu cukrzycy [7]. Nie jest pewne, czy powyższe rozbieżności są przypadkowe, czy też odzwierciedlają różnorodne uwarunkowania genetyczne w odmiennych populacjach.

Ilościowe zależności między karnozyną a karnozynazą nie są proste [39,40]. Nie można tłumaczyć natężenia działania karnozyny tylko w odniesieniu do aktywności karnozynazy. Surowicza karnozynaza rozkłada także inne peptydy histydynowe, tj. anserynę i homokarnozynę, ale karnozyna pozostaje dla niej głównym substratem [29,53]. W badaniach Peters i wsp. u zdrowych dorosłych wykazano, że w porównaniu z karnozyną, homokarnozyna jest rozkładana prawie 50 razy wolniej, a anseryna prawie 200 [39]. Stwierdzono ponadto, że aktywność karnozynazy w surowicy jest bardzo zróżnicowana międzysobniczo (np. w odniesieniu do karnozyny wynosi 0,9–5,9 umol/ml/h) i znacząco nie koreluje ze stężeniem dipeptydów histydynowych. Odnotowano również nieenzymatyczne hamowanie hydrolizy karnozyny przez homokarnozynę i anserynę. Obserwacje te sugerują, że stężenie karnozyny w surowicy, a zatem także efekty jej ogólnoustrojowych oddziaływań, nie zależą tylko od aktywności surowiczej karnozynazy, ale również od stężenia pozostałych dipeptydów histydynowych i ich transportu we krwi. Regulacja może się dokonywać także przez przechodzenie karnozyny do tkanek i wydalanie jej przez nerki. Zdaniem Peters i wsp., ze względu na bardzo niskie stężenie karnozyny w surowicy i brak jego korelacji z aktywnością surowiczej karnozynazy, jest bardzo prawdopodobne, że w rozwoju nefropatii cukrzycowej decydującą rolę odgrywa lokalny metabolizm karnozyny [39]. Przemawia za tym także odnotowana w badaniach Jansena i wsp. wysoka ekspresja genu *CNDP1* w podocytach i komórkach nabłonka ściennego kłębuszków nerkowych u chorych z nefropatią cukrzycową [24].

W niedawno opublikowanej, kolejnej pracy Peters i wsp. przedstawiono wyniki badań nad nerkowym metabolizmem karnozyny u db/db myszy (mysi model nefropatii cukrzycowej) [40]. Stwierdzono zwiększoną aktywność karnozynazy i dziecięciokrotnie obniżone stężenie anseryny w nerkach osobników z cukrzycą w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast stężenie karnozyny istotnie nie różniło się. Zgodnie z wynikami badań Riedla i wsp. [42], zasadnicze znaczenie dla sekrecji i aktywności karnozynazy w cukrzycy ma N-glikozylacja. Obserwowany wzrost aktywności karnozynazy u chorych myszy można więc tłumaczyć hiperglikemią wskutek złej kontroli glukozy. W badaniach Peters i wsp. leczenie egzogenną karnozyną db/db myszy normalizowało aktywność karnozynazy i stężenia anseryny w nerkach, ponadto obniżało przepuszczalność naczyń nerkowych, zmniejszało proteinurię i glikemię [40]. Autorzy wskazują na dwa mechanizmy obniżenia aktywności karnozynazy pomimo dostarczania substratu dla enzymu: zmniejszenie stężenia glukozy we krwi, powodujące redukcję N-glikozylacji karnozyny oraz wzrost stężenia anseryny jako produktu egzogennej karnozyny.

Znaczenie polimorfizmu genu *CNDP1* i aktywności karnozynazy było także badane w rozwoju przewlekłej choroby nerek o niecukrzycowej etiologii [27]. W badaniach rodzin obejmujących dziecko z przewlekłą chorobą nerek (PChN) i dwoje jego biologicznych, zdrowych rodziców, nie stwierdzono istotnych różnic w przekazywaniu alleli polimorfizmu genu *CNDP1* od heterozygotycznych rodziców chorych na PChN w przebiegu przewlekłego cewkowo-śródmiąższowego zapalenia nerek. Sugeruje to, że polimorfizm ten nie ma znaczenia w rozwoju niewydolności nerek u pacjentów cierpiących na to schorzenie. Wykazano natomiast związek polimorfizmu *CNDP1* z rozwojem PChN w przebiegu glomerulopatii. Odmienne jednak niż u osób z nefropatią cukrzycową, najkrótsza forma alleliczna wariantu D18S880, tj. 5, w większym stopniu predysponowała do uszkodzenia nerek [27]. Ci sami autorzy stwierdzili istotnie większą aktywność karnozynazy w surowicy osób chorych w porównaniu do obserwowanej u ich rodziców, niewykazujących cech dysfunkcji nerek, co może przemawiać za patofizjologiczną rolą tego enzymu w rozwoju różnych nefropatii, nie tylko o cukrzycowej etiologii. Interpretacja powyższych wyników musi być ostrożna. Obecnie wiadomo, że wiele czynników może wpływać na aktywność karnozynazy [40,42,43]. Większa aktywność karnozynazy i zakładane w konsekwencji niższe stężenie jej naturalnego substratu – karnozyny, może być przejawem osłabienia antyoksydacyjnego i cytoprotekcyjnego działania tego dwupeptydu w PChN. Pod uwagę muszą być brane także zaburzenia metabolizmu peptydów histydynowych i/lub brak właściwych reakcji adaptacyjnych nerek objętych procesem chorobowym. W badaniach różnych autorów nie potwierdzono opisywanego przez Jansena i wsp. istotnego statystycznie związku między genotypem wariantu D18S880 genu *CNDP1* a aktywnością karnozynazy w surowicy [7,27]. Zaobserwowano natomiast tendencję do mniejszej aktywności enzymu u osób z genotypem 6-6 w porównaniu do nosicieli genotypów 5-6 i 6-7 [27]. Jednym z silnych aktywatorów karnozynazy jest kadm [29,53]. W zaawansowanych stadiach PChN dochodzi do kumulacji tego pierwiastka w organizmie, m.in. w nerkach i w kościach [55]. Podwyższone stężenie kadmu stwierdzono we krwi pacjentów leczonych nerkozastępczo [54]. Wykazuje on działanie prooksydacyjne, polegające m.in. na obniżeniu stężenia antyoksydantów we krwi. Kadm prowadzi do zmiany aktywności enzymów, zależnej od jonów metali. Nie można wykluczyć, że wzrost aktywności karnozynazy w surowicy chorych na PChN związany jest z kumulacją tego pierwiastka śladowego.

## PODSUMOWANIE

W 2005 r. określono karnozynę jako „zapomniany i tajemniczy peptyd” [3]. Badania, w większości eksperymentalne, nad tym naturalnie występującym związkem, o licznych właściwościach biologicznych wciąż trwają, dalej jednak nie uzyskano odpowiedzi na wiele pytań związanych z jego metabolizmem i funkcjami w organizmie człowieka. Karnozyna w surowicy występuje w bardzo niskich stężeniach, na granicy wykrywalności, co stwarza ograniczenia badawcze, ale jej udział w licznych metabolicznych szlakach inspiruje do dalszych poszukiwań. Potrzeba ich istnieje szczególnie w schorzeniach nerek ze względu na nefroprotekcyjny charakter karnozyny. W 2011 r. opisano karnozynę jako imitator rapamycyny, makrolidu m.in.

wykazującego właściwości immunosupresyjne i antyproliferacyjne o uznanej pozycji w nefrologii i transplantologii [19]. Karnozyna, tak jak rapamycyna, ma regulować

fosforylację czynnika inicjującego wiązanie białek szlaku mTOR/FRAP. Nadzieje terapeutyczne związane z tym dwupeptydem wzrastają.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Alhamedani M.S., Al-Azzawie H.F., Abbas F.K.: Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. *Perit. Dial. Int.*, 2007; 27: 86–89
- [2] Alhamedani M.S., Al-Kassir A.H., Abbas F.K., Jaleel N.A., Al-Tae M.F.: Antigliation and antioxidant effect of carnosine against glucose degradation products in peritoneal mesothelial cells. *Nephron Clin. Pract.*, 2007; 107: c26–c34
- [3] Bauer K.: Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem. Res.*, 2005; 30: 1339–1345
- [4] Blázquez-Medela A.M., López-Novoa J.M., Martínez-Salgado C.: Mechanisms involved in the genesis of diabetic nephropathy. *Curr. Diabetes Rev.*, 2010; 6: 68–87
- [5] Boldyrev A.A.: Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. *Biochemistry (Mosc)*, 2000; 65: 751–756
- [6] Boldyrev A.A., Severin S.E.: The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv. Enzyme Regul.*, 1990; 30: 175–194
- [7] Chakker A.H., Hanson R.L., Kobes S., Millis M.P., Nelson R.G., Knowler W.C., Distefano J.K.: Association of variants in the carnosine peptidase 1 gene (*CNDP1*) with diabetic nephropathy in American Indians. *Mol. Genet. Metab.*, 2011; 103: 185–190
- [8] Chan W.K., Decker E.A., Chow C.K., Boissonneault G.A.: Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. *Lipids*, 1994; 29: 461–466
- [9] Coombes J.S., Fassett R.G.: Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. *Kidney Int.*, 2012; 81: 233–246
- [10] Cuzzocrea S., Genovese T., Failla M., Vecchio G., Fruciano M., Mazzon E., Di Paola R., Muia C., La Rosa C., Crimi N., Rizzarelli E., Vancheri C.: Protective effect of orally administered carnosine on bleomycin-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2007; 292: L1095–L1104
- [11] Fujii T., Kurata H., Takaoka M., Muraoka T., Fujisawa Y., Shokoji T., Nishiyama A., Abe Y., Matsumura Y.: The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 481: 241–248
- [12] Fujii T., Takaoka M., Muraoka T., Kurata H., Tsuruoka N., Ono H., Kiso Y., Tanaka T., Matsumura Y.: Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 474: 261–267
- [13] Fujii T., Takaoka M., Tsuruoka N., Kiso Y., Tanaka T., Matsumura Y.: Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005; 28: 361–363
- [14] Gardner M.L., Illingworth K.M., Kelleher J., Wood D.: Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J. Physiol.*, 1991; 439: 411–422
- [15] Gariballa S.E., Sinclair A.J.: Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing*, 2000; 29: 207–210
- [16] Guiotto A., Calderan A., Ruzza P., Borin G.: Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 2293–2315
- [17] Hipkiss A.R.: Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv. Food. Nutr. Res.*, 2009; 57: 87–154
- [18] Hipkiss A.R.: On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. *Exp. Gerontol.*, 2009; 44: 237–242
- [19] Hipkiss A.R.: Energy metabolism, proteotoxic stress and age-related dysfunction – protection by carnosine. *Mol. Aspects Med.*, 2011; 32: 267–278
- [20] Hipkiss A.R., Brownson C.: A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000; 57: 747–753
- [21] Hipkiss A.R., Chana H.: Carnosinase protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 248: 28–32
- [22] Hipkiss A.R., Worthington V.C., Himsworth D.T., Herwig W.: Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1380: 46–54
- [23] Hou W.C., Chen H.J., Lin Y.H.: Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51: 1706–1709
- [24] Janssen B., Hohenadel D., Brinkkoetter P., Peters V., Rind N., Fischer C., Rychlik I., Cerna M., Romzova M., de Heer E., Baelde H., Bakker S.J., Zirie M., Rondeau E., Mathieson P., Saleem M.A., Meyer J., Köppel H., Sauerhoefer S., Bartram C.R., Nawroth P., Hammes H.P., Yard B.A., Zschocke J., van der Woude F.J.: Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: association with a leucine repeat of the carnosinase gene *CNDP1*. *Diabetes*, 2005; 54: 2320–2327
- [25] Jia H., Qi X., Fang S., Jin Y., Han X., Wang Y., Wang A., Zhou H.: Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression. *Regul. Pept.*, 2009; 154: 69–76
- [26] Johnson P., Hammer J.L.: Histidine dipeptide levels in aging and hypertensive rat skeletal and cardiac muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 1992; 103: 981–984
- [27] Kiliś-Pstrusińska K., Zwolińska D., Grzeszczak W., Study Group: Is carnosinase 1 gene (*CNDP1*) polymorphism associated with chronic kidney disease progression in children and young adults? Results of a family-based study. *Arch. Med. Res.*, 2010; 41: 356–362
- [28] Kurata H., Fujii T., Tsutsui H., Katayama T., Ohkita M., Takaoka M., Tsuruoka N., Kiso Y., Ohno Y., Fujisawa Y., Shokoji T., Nishiyama A., Abe Y., Matsumura Y.: Renoprotective effects of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006; 319: 640–647
- [29] Lenney J.F., George R.P., Weiss A.M., Kucera C.M., Chan P.W., Rinzler G.S.: Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin. Chim. Acta*, 1982; 123: 221–231
- [30] Liu B.F., Miyata S., Hirota Y., Higo S., Miyazaki H., Fukunaga M., Hamada Y., Ueyama S., Muramoto O., Uriuhara A., Kasuga M.: Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney Int.*, 2003; 63: 947–957
- [31] Maher P., Dargusch R., Ehren J.L., Okada S., Sharma K., Schubert D.: Fisetin lowers methylglyoxal dependent protein glycation and limits the complications of diabetes. *PLoS One*, 2011; 6: e21226
- [32] McDonough C.W., Hicks P.J., Lu L., Langefeld C.D., Freedman B.I., Bowden D.W.: The influence of carnosinase gene polymorphisms on diabetic nephropathy risk in African-Americans. *Hum. Genet.*, 2009; 126: 265–275
- [33] McFarland G.A., Holliday R.: Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp. Gerontol.*, 1999; 34: 35–45
- [34] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Lekarska, PZWL, Warszawa* 1996, 414–415
- [35] Nagai K., Nijijima A., Yamano T., Otani H., Okumura N., Tsuruoka N., Nakai M., Kiso Y.: Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2003; 228: 1138–1145
- [36] Nagai K., Suda T.: Realization of spontaneous healing function by carnosine. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1988; 10: 497–507
- [37] Nijijima A., Okui T., Matsumura Y., Yamano T., Tsuruoka N., Kiso Y., Nagai K.: Effects of L-carnosine on renal sympathetic nerve activity and DOCA-salt hypertension in rats. *Auton. Neurosci.*, 2002; 97: 99–102
- [38] Pan K.Z., Palter J.E., Rogers A.N., Olsen A., Chen D., Lithgow G.J., Kapahi P.: Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2007; 6: 111–119
- [39] Peters V., Jansen E.E., Jakobs C., Riedl E., Janssen B., Yard B.A., Wedel J., Hoffmann G.F., Zschocke J., Gotthardt D., Fischer C., Köppel H.: Anserine inhibits carnosine degradation but in human serum carnosinase (CN1) is not correlated with histidine dipeptide concentration. *Clin. Chim. Acta*, 2011; 412: 263–267
- [40] Peters V., Schmitt C.P., Zschocke J., Gross M.L., Brismar K., Forsberg E.: Carnosine treatment largely prevents alterations of renal carnosine metabolism in diabetic mice. *Amino Acids*, 2011 (w druku)

- [41] Quinn P.J., Boldyrev A.A., Formazuyk V.E.: Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.*, 1992; 13: 379–444
- [42] Riedl E., Koeppel H., Pfister F., Peters V., Sauerhoefer S., Sternik P., Brinkkötter P., Zentgraf H., Navis G., Henning R.H., Van Den Born J., Bakker S.J., Janssen B., van der Woude F.J., Yard B.A.: N-glycosylation of carnosinase influences protein secretion and enzyme activity: implications for hyperglycemia. *Diabetes*, 2010; 59: 1984–1990
- [43] Riedl E., Pfister F., Braunagel M., Brinkkötter P., Sternik P., Deinzer M., Bakker S.J., Henning R.H., van den Born J., Krämer B.K., Navis G., Hammes H.P., Yard B., Koeppel H.: Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2011; 28: 279–288
- [44] Roberts P.R., Zaloga G.P.: Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry (Mosc)*, 2000; 65: 856–861
- [45] Shao L., Li Q.H., Tan Z.: L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 324: 931–936
- [46] Sodhi C.P., Phadke S.A., Battle D., Sahai A.: Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2001; 280: F667–F674
- [47] Soliman K.M., Abdul-Hamid M., Othman A.I.: Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Med. Sci. Monit.*, 2007; 13(3): BR73–BR83
- [48] Son D.O., Satsu H., Kiso Y., Totsuka M., Shimizu M.: Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine*, 2008; 42: 265–276
- [49] Tamaki N., Funatsuka A., Fujimoto S., Hama T.: The utilization of carnosine in rats fed on a histidine-free diet and its effect on the levels of tissue histidine and carnosine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 1984; 30: 541–551
- [50] Tamaki N., Ikeda T., Fujimoto S., Mizutani N.: Carnosine as a histidine source: transport and hydrolysis of exogenous carnosine by rat intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1985; 31: 607–618
- [51] Tan K.M., Candlish J.K.: Carnosine and anserine as modulators of neutrophil function. *Clin. Lab. Haematol.*, 1998; 20: 239–244
- [52] Tanida M., Nijima A., Fukuda Y., Sawai H., Tsuruoka N., Shen J., Yamada S., Kiso Y., Nagai K.: Dose-dependent effects of L-carnosine on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2005; 288: R447–R455
- [53] Teufel M., Saudek V., Ledig J.P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., Cairns N.J., Carter C., Cowley D.J., Duverger D., Ganzhorn A.J., Guenet C., Heintzelmann B., Laucher V., Sauvage C., Smirnova T.: Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 6521–6531
- [54] Van Renterghem D., Cornelis R., Vanholder R.: Behaviour of 12 trace elements in serum of uremic patients on hemodiafiltration. *J. Trace Elem. Electrolytes Health. Dis.*, 1992; 6: 169–174
- [55] Vanholder R., Cornelis R., Dhondt A., Lameire N.: The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002; 17(Suppl. 2): 2–8
- [56] Wanic K., Placha G., Dunn J., Smiles A., Warram J.H., Krolewski A.S.: Exclusion of polymorphisms in carnosinase genes (CNDP1 and CNDP2) as a cause of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: results of large case-control and follow-up studies. *Diabetes*, 2008; 57: 2547–2551
- [57] Willi S.M., Zhang Y., Hill J.B., Phelan M.C., Michaelis R.C., Holden K.R.: A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatr. Res.*, 1997; 41: 210–213

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.