

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2002

Е. В. Ефимова¹, Т. А. Гуськова¹, В. М. Копелевич², В. И. Гунар²

АЦЕТИЛ-*L*-КАРНИТИН: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)

¹ ГУП ЦХЛС-ВНИХФИ;

² ГУП ГНИИ витаминов, Москва

Среди большого количества эндогенных веществ, используемых в качестве лекарственных средств, особое место занимает *L*-карнитин (LC), который участвует в регуляции разнообразных метаболических процессов в организме млекопитающих, включающих транспорт длинноцепочечных жирных кислот в матрикс митохондрий, и, следовательно, участвует в процессе утилизации жирных кислот и выработки энергии, а также в модуляции внутримитохондриального соотношения ацетил-КоА/КоА или уровня свободного КоА и удалении ацетил-КоА из митохондрий. Последнее обстоятельство играет важную роль в детоксикации ацетил-КоА при различных патологических состояниях и наследственных заболеваниях.

В тканях, органах (мышцах, сердце, семенниках) и физиологических жидкостях млекопитающих LC присутствует в виде свободной формы и его *O*-ацильных производных. Гомеостатическое равновесие LC и его производных эффективно контролируется различными механизмами [1].

Важнейшим эфиром карнитина, обнаруженным в тканях животных, является его ацетилированная форма, ацетил-*L*-карнитин (ALC) [2].

1. Биологические свойства ALC.

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных, подтверждающих позитивную роль ALC в поддержании функциональной активности различных органов при различных патологических процессах и при старении.

ALC аккумулируется в мышечных волокнах I типа во время длительной физической нагрузки, что, возможно, связано с высоким содержанием митохондрий в этом типе мышечных волокон и может отражать улучшение окислительного метаболизма в мышцах [3, 4].

Изменения в метаболизме жирных кислот в митохондриях при старении организма могут лежать в основе прогрессирующего истощения сердечной мышцы, а ALC способен ослаблять возрастное снижение активности карнитин-ацетилтрансферазы и некоторых ключевых ферментов биохимических процессов в митохондриях сердечной мышцы путем восстановления в ней физиологического содержания кардиолипина [5, 6].

На модели транзиторной ишемии мозга показано, что предварительное введение ALC оказывает нейро-

протективное действие путем восстановления метаболизма в пораженных областях (кора мозга, гиппокамп, полосатое тело) [7].

Врожденная гипераммонемия

Нарушение энзиматического баланса цикла мочевиной кислоты на стадии эмбриогенеза приводит к дефициту орнитинтранскарбамилазы (ОТС), что определяет развитие гипераммонемического синдрома в постнатальном периоде развития.

Мыши линии *spf*, у которых, как и у человека, недостаточность ОТС является признаком, сцепленным с полом, используются в качестве модели для изучения нейрпатологических проявлений врожденной гипераммонемии.

В нейрофизиологических экспериментах показано, что нарушение функциональной целостности центральных холинергических механизмов проявляется в прогрессирующем снижении активности ацетилхолинтрансферазы и высокоаффинного захвата [³H] холина в некоторых структурах мозга, а также в снижении количества *m*₁-холинорецепторов, коррелирующем с дегенерацией холинергических нейронов [8].

При врожденной гипераммонемии добавление ALC в воду для питья мышам самкам, начиная с 1-го дня беременности, приводит к значительному повышению активности ацетилхолинтрансферазы в структурах мозга у потомства [9].

Повышение уровней аммиака и глутамата в мозге может снижать активность цитохром С оксидазы (СОХ) и экспрессию ее м-РНК, нарушая тем самым энергетическое обеспечение структур мозга, при этом изменение активности ферментов дыхательной цепи более выражено в нейрональных, а не синапсомальных, митохондриях. Кратковременное применение ALC нормализует энергетический метаболизм в мозге путем восстановления активности дыхательных ферментов [10, 11]. В связи с тем, что СОХ является одним из ферментов дыхательной цепи, локализованным в митохондриальной мембране, в исследовании, проведенном с целью попытки объяснения механизма действия ALC, было показано, что его кратковременное введение восстанавливает активность СОХ, экспрессию ее м-РНК в печени и соотношение холестерина – фосфолипид в мембране митохондрий, а также продукцию АТФ [12].

Нарушения, выявляемые при диабетической нейропатии, включают в себя нейрональные, метаболические и сосудистые компоненты. Накопление жирных кислот с длинной цепью и нарушение их β -окисления в связи с недостаточностью карнитина и/или его этерифицированных производных, таких как ALC, могут иметь неблагоприятные последствия [13].

Экспериментальной моделью для изучения диабетической нейропатии является стрептозотин-индуцированный диабет у крыс, при котором наблюдается стойкое снижение толщины миелиновой оболочки, количества высокомиелинизированных волокон и скорости проведения возбуждения по нервным волокнам. Применение ALC устраняет связанные с гипергликемией функциональные, структурные и биохимические нарушения в миелиновой оболочке нервов [14]. Показано, что ALC улучшает проводимость как в моторных, так и в чувствительных нервах, восстанавливает недостаточность эндоневрального кровоснабжения, повышает активность Na^+/K^+ — АТФ-азы и восстанавливает ретроградный аксоплазматический ток [15 – 19].

На модели стрептозотин-индуцированного диабета у крыс длительное (4 недели) введение ALC приводит к устранению тахикардии, восстановлению сниженной скорости проводимости в моторных нервах и кровотока в седалищном нерве, а также к снижению содержания сорбитола и повышению уровня миоинозитола и свободного карнитина. Эти данные подтверждают тот факт, что существует тесная связь между изменением ферментативной активности в последовательности гликолитических реакций, а также дефицитом карнитина с развитием диабетической нейропатии [17].

Нарушение метаболизма жирных кислот и/или их аккумуляция в нервах могут ухудшать их функционирование за счет изменения интеграции клеточной и митохондриальной мембран, внутриклеточного метаболизма и энергетического обеспечения. Показано, что ALC способствует повышению уровня жирных кислот в большеберцовых нервах, дозо-зависимо препятствует снижению активности Na^+/K^+ — АТФ-азы и скорости проводимости, что свидетельствует в пользу предположения, согласно которому дисбаланс карнитиновой системы является одним из факторов изменения энергетического метаболизма и функциональных нарушений при диабете [18, 20].

Это предположение подтверждается также исследованиями по изучению содержания компонентов LC у крыс линии Wistar с генетической предрасположенностью к диабету (BB/BB), у которых было выявлено снижение в крови уровня общего карнитина, LC, ALC и короткоцепочечных эфиров LC по сравнению со здоровыми животными, что совпадает с результатами экспериментов на крысах со стрептозотин-индуцированным диабетом. Почечный клиренс компонентов LC был выше у крыс BB/BB (как и у крыс со стрептозото-

цин-индуцированным диабетом), что, возможно, связано со снижением в крови пула эндогенного карнитина.

Отсутствие повышенной почечной экскреции компонентов LC у крыс с диабетом, несмотря на существенное увеличение диуреза, позволяет полагать, что уровень канальцевой реабсорбции компонентов LC является основным механизмом для сохранения их гомеостатического равновесия, а снижение их содержания в крови приводит к различным системным метаболическим изменениям и патологическим проявлениям, в том числе — диабетической нейропатии [21].

Заболевания нервной системы

ALC обладает выраженным нейропротективным эффектом при дегенерации мотонейронов, что проявляется в положительных морфологических изменениях ядра; эти данные подтверждают гипотезу о способности мотонейронов к регенерации [22, 23].

ALC оказывает протективное воздействие и на функционирование нервно-мышечных синапсов, а также на структуру мышечных волокон. Экспериментально показано, что при нарушении целостности седалищного нерва длительное введение ALC повышает функциональную активность концевой пластинки нервно-мышечных синапсов. Известно, что структура камбаловидных мышц у крыс с возрастом изменяется и проявляется в основном в атрофии волокон II типа и нарушении мозаичной организации мышечных волокон, однако у старых крыс, длительно получавших ALC, она оставалась сходной с таковой у молодых животных [24].

При исследовании ультраструктуры зон синаптических контактов (количество синапсов, плотность их поверхности, средняя ширина синаптической щели и общая площадь зоны синаптического контакта) в гиппокампе крыс было показано, что длительное введение ALC способствует продолжительной позитивной модуляции динамики синаптической структуры. Считают, что нормальное течение метаболических процессов в нервных окончаниях играет решающую роль в генерации синаптического потенциала, а ALC может улучшать биоэнергетические процессы в нервных окончаниях [25, 26].

Имеются данные, что ALC существенно повышает уровень аденозина и АТФ в плазме крови, что может свидетельствовать об участии эндогенной пуриновой системы в реализации эффектов ALC [27].

Процессы старения в центральной нервной системе характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов. Снижение уровня центральных нейротрофических факторов и рецепторов является одной из причин начала дегенеративных процессов, поэтому рациональным терапевтическим подходом явилось бы поддержание дегенерирующих нейронов с помощью трофических факторов или стимуляции эндогенной нейротрофической активности [28]. Известно, что фактор роста нервов (NGF) является нейротрофическим веществом для нейронов периферической и

центральной нервной системы. Показано, что ALC обладает нейропротективным воздействием на центральные холинергические нейроны, восстанавливая уровень низкоаффинных рецепторов NGF в различных участках мозга старых крыс, что должно способствовать улучшению трофического влияния NGF на те холинергические нейроны центральной нервной системы, в которых происходят дегенеративные процессы, связанные с возрастом [29].

Результаты исследования распределения в мозге меченого ALC дают основание полагать, что его эндогенный уровень в плазме играет определенную роль в переносе ацетильных групп в мозг; особенно в период энергетического кризиса [30].

Связывание ALC, стереоселективного конкурента LC, с синаптической мембраной характеризуется высокой аффинностью и уровнем насыщения; оно является обратимым и зависит от концентрации, pH, ионного градиента и температуры. Наивысшая степень связывания регистрируется в спинном мозге и далее в порядке убывания: продолговатый мозг – мост \geq полостное тело \geq мозжечок \geq кора мозга = гиппокамп = гипоталамус = обонятельные луковицы [31].

При изучении движения атомов углерода в анаболических процессах в мозге, происходящих на региональном уровне, в латеральный желудочек мозга бодрствующих животных вводили $^{14}\text{C} = \text{ALC}$. Анализ распределения радиоактивной метки в различных липидных фракциях показал, что ацетильная группа жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, содержала большую часть метки, а их профиль указывал на то, что ацетильная группа ALC включалась в насыщенные (60 %), полиненасыщенные (25 %) и мононенасыщенные (15 %) жирные кислоты. Эти данные указывают на то, что ALC является важной составной частью комплексной системы ацетатного транспорта в липидном метаболизме мозга [32].

Исследование влияния ALC на метаболизм меченой глюкозы в мозге крыс показало, что церебральный уровень вновь синтезированного гликогена был выше у животных, получавших ALC, что дает основание полагать о его способности модулировать утилизацию глюкозы в мозге [33].

ALC способствует также повышению активности ферментов (цитохромоксидазы и α -кетоглутаратдегидрогеназы), связанных с процессами энергетической трансдукции в интрасинаптических митохондриях коры головного мозга крыс [34].

Изолированные нейроны коры головного мозга крыс способны аккумулировать LC, поступление которого в клетки зависит от температуры, ионного градиента и полностью подавляется ГАМК, имеющей с ним структурное сходство [35, 36]. Показано, что снижение уровня ALC коррелирует со степенью ингибирования карнитинацетилтрансферазы, участвующей в процессе поставки ацетильных групп при синтезе ацетилхолина [37].

Антиамнестическое действие ALC

На модели поведения животных (тест Морриса) показано, что ALC корректирует некоторые когнитивные нарушения, проявляющиеся с возрастом и при введении лабораторным животным некоторых фармакологических агентов (стрептозотоцина, цианида Na, скополамина).

Введение стрептозотоцина крысам подавляет утилизацию глюкозы в мозге, приводит к нарушению нейротрансмиссии и вызывает поведенческие реакции, сходные с симптомами болезни Альцгеймера (БА). При изучении активности ферментов (пептидазы, дегидрогеназы, ацетилтрансферазы) в перегородке мозга и гиппокампе было показано, что стрептозотоцин вызывает снижение массы септума и активности ферментов, которое частично предотвращается ALC [38]. Кроме того, длительное введение ALC крысам среднего возраста улучшает пространственную память и повышает активность холинацетилтрансферазы в гиппокампе [39].

На модели скополамин-индуцированных поведенческих нарушений ALC повышает активность протеинкиназы C в коре мозга, что, возможно, определяет его антиамнестический эффект [40].

Таким образом, ALC улучшает когнитивные функции как у экспериментальных животных с соответствующей патологией, так и у интактных старых крыс, у которых наблюдается естественное ухудшение способности к пространственной ориентации и обучаемости [41, 42].

При исследовании возможного механизма антиамнестического действия ALC изучали последствия его добавления в пищевой рацион старых крыс. Показано, что ALC существенно повышает клеточное дыхание, мембранный потенциал митохондрий и уровень кардиолипина одновременно с увеличением образования свободных радикалов; при этом улучшается также двигательная активность [43].

2. Перспективы клинического применения ALC.

Из анализа экспериментальных данных становится очевидным, что проявляемые эффекты ALC многогранны, поэтому вполне обоснован интерес клиницистов к его изучению в различных областях медицины.

Стимулирующее действие ALC на ЦНС и накопление LC в мышцах во время физической нагрузки, способствующее усилению метаболических процессов, определяет его успешное применение в спортивной медицине. На здоровых добровольцах показано, что наряду с повышением уровня молочной кислоты в биоптатах скелетных мышц при интенсивной физической нагрузке повышается содержание ALC, ацетил-КоА и свободных АДФ и АМФ [44, 45].

В клинических исследованиях установлено положительное влияние ALC на циркадные ритмы показателей гемодинамики, липидного и белкового обмена у больных с ишемической болезнью и сердечной недостаточностью II – III функционального класса [46].

Нейропротективное действие ALC может иметь клиническое значение при оперативном шунтировании в плане предотвращения развития ишемического инсульта [7, 47, 48].

Нейротрофическая активность ALC открывает возможность его клинического изучения в сочетании с другими препаратами для коррекции неблагоприятных проявлений гипераммониемического синдрома у детей [10 – 12].

В ряде случаев симптомы периферической нейропатии (ПН) могут развиваться у людей, не страдающих сахарным диабетом. В клинических исследованиях показано, что применение ALC у больных с ПН в течение 15 дней приводит к улучшению клинического состояния [49].

Истощение запасов ALC в периферических нервах может являться одной из причин нейротоксичности препаратов, применяемых для лечения синдрома иммунодефицита, поэтому ALC и NGF могут рассматриваться в качестве потенциальных лекарственных средств для купирования проявлений ПН [50, 51].

Результаты электрофизиологических исследований, проведенных на здоровых добровольцах, больных с медленно прогрессирующими парализациями и больных с повреждениями спинномозговых корешков, позволяют рассматривать возможность применения ALC в качестве диагностического средства у людей со спинномозговой патологией [52, 53].

ALC может оказывать положительное влияние на нервно-мышечные синапсы и структуру мышечных волокон при их возрастных изменениях или в результате травмы [24].

Приведенные выше положительные результаты, полученные при изучении влияния ALC на когнитивные функции у экспериментальных животных, явились основанием для его изучения у больных БА.

По данным одногодичного двойного-слепого плацебо-контролируемого рандомизированного исследования, проведенного на пациентах с умеренно выраженными симптомами БА, ALC оказывает более выраженное улучшение клинического состояния у пациентов в возрасте до 65 лет, чем у более пожилых [54, 55].

При лечении ALC наблюдается нормализация уровня высокоэнергетических фосфатов в мозге, что является подтверждением благотворного влияния препарата как на клинические, так и на нейрохимические показатели при AD [56].

Анализ литературных данных позволяет сделать вывод о том, что эндогенный ALC играет в организме немаловажную роль, а его дефицит может приводить к развитию тяжелых, порой медленно прогрессирующих заболеваний, приводящих к инвалидизации больных. В связи с этим разработка и внедрение в медицинскую практику лекарственных форм ALC могут внести весомый вклад в арсенал препаратов для лечения ПН разной этиологии, а также при различных формах деменций, включая БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Marzo and S. Curti, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **702**(1 – 2), 1 – 20 (1997).
2. L. L. Bieber, R. Emaus, K. Valkner, et al., *Fed. Proc.*, **41**, 2852 – 2862 (1982).
3. R. Gatti, C. B. De Palo, P. Spinella, et al., *Amino Acids*, **14**(4), 361 – 369 (1998).
4. D. Constantin-Teodosiu, S. Howell and P. L. Greenhaff, *J. Appl. Physiol.*, **80**(3), 1061 – 1064 (1996).
5. G. Paradies, F. M. Ruggiero, G. Petrosillo, et al., *FEBS Lett.*, **350**(2 – 3), 213 – 215 (1994).
6. G. Paradies, Ruggiero F. M., G. Petrosillo, et al., *Mech. Ageing Dev.*, **84**(2), 103 – 112 (1995).
7. A. Shuaib, T. Wagaar, T. Wishart, et al., *Neurochem. Res.*, **20**(9), 1021 – 1025 (1995).
8. R. F. Butterworth, *Dev. Neurosci.*, **20**(4 – 5), 478 – 484 (1998).
9. L. Ratnakumari, I. A. Gureshi, D. Maysinger, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**(1), 437 – 443 (1995).
10. K. V. Rao, Y. R. Mawal and I. A. Qureshi, *Neurosci. Lett.*, **224**(2), 83 – 86 (1997).
11. K. Gureshi, K. V. Rao, I. A. Gureshi, *Neurochem. Res.*, **23**(6), 855 – 861 (1998).
12. Y. R. Mawal, K. V. Rama Rao and I. A. Qureshi, *Biochem. Pharmacol.*, **55**(11), 1853 – 1860 (1998).
13. A. A. Sima, H. Ristic, A. Merry, et al., *J. Clin. Invest.*, **97**(8), 1900 – 1907 (1996).
14. J. I. Malone, S. Lowitt, A. F. Salem, et al., *Metabolism*, **45**(7), 902 – 907 (1996).
15. M. A. Cotter, N. E. Cameron, A. Keegan, et al., *Metabolism*, **44**(9), 1209 – 1214 (1995).
16. I. L. Soneru, T. Khan, Z. Orfalian, et al., *Endocr. Res.*, **23**(1 – 2), 27 – 36 (1997).
17. J. Nakamura, N. Koh, F. Sakakibara, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**(3), 897 – 902 (1998).
18. Y. Ido, J. McHowat, K. C. Chang, et al., *Diabetes*, **43**(12), 1469 – 1477 (1994).
19. M. Kano, T. Kawakami, H. Hori, et al., *Neurosci. Res.*, **33**(3), 207 – 213 (1999).
20. M. J. Stevens, S. A. Lattimer, E. L. Feldman, et al., *Metabolism*, **45**(7), 865 – 872 (1996).
21. E. Morabito, N. Corsico, A. Marzo, et al., *Arzneimittelforsch.*, **44**(8), 965 – 968 (1994).
22. E. Fernandes, R. Pallini, G. Tamburrini, et al., *Neurol. Res.*, **17**(5), 373 – 376 (1995).
23. E. Fernandes, R. Pallini, L. Lauretti, et al., *Arch. Ital. Biol.*, **135**(4), 343 – 351 (1997).
24. C. De Angelis C, C. Scarfo, and M. Falcinelli, *Mech. Ageing Dev.*, **85**(1), 37 – 53 (1995).
25. C. Bertoni-Freddari, P. Fatoletti, T. Casoli, et al., *Brain Res.*, **656**(2), 359 – 366 (1994).
26. C. Bertoni-Freddari, P. Fatoletti, U. Caselli, et al., *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **18**(4), 275 – 278 (1996).
27. P. L. Capocchi, F. Laghi Pasini, E. Quartarolo, et al., *Vasc. Med.*, **2**(2), 77 – 81 (1997).
28. G. Tagliatalata, D. Navarra, M. T. Olivi A, et al., *Neurochem. Res.*, **20**(1), 1 – 9 (1995).
29. P. J. Foreman, J. R. Perez-Polo, L. Angelucci, et al., *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **19**(1), 117 – 133 (1995).
30. H. Kuratsune, Y. Watanabe, K. Yamaguti, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**(2), 488 – 493 (1997).
31. L. Vesci, P. Tobia, N. Corsico, et al., *J. Neurochem.*, **64**(6), 2783 – 2791 (1995).
32. R. Ricciolini, M. Scalibastri, J. K. Kelleher, et al., *J. Neurochem.*, **71**(6), 2510 – 2517 (1998).
33. T. Aureli, M. E. Di Cocco, C. Puccetti, et al., *Brain Res.*, **769**(1 – 2), 75 – 81 (1998).
34. A. Gorini, A. D' Angelo and R. F. Villa, *Neurochem. Res.*, **23**(12), 1485 – 1489 (1998).
35. M. A. Virmani, R. Conti, A. Spadoni, et al., *Brain Res.*, **25**(1 – 2), 105 – 112 (1994).

36. M. A. Virmani, R. Conti, A. Spadoni, et al., *Pharmacol. Res.*, **31**(3–4), 211–215 (1995).
37. A. Wawrzenczyk, K. A. Nalecz and M. J. Nalecz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**(2), 383–388 (1995).
38. D. Terwel, J. Prickaerts, F. Meng, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **287**(1), 65–71 (1995).
39. J. Prickaerts, A. Blokland, W. Honing, et al., *Brain Res.*, **674**(1), 142–146 (1995).
40. A. Pascale, S. Milano, N. Corsico, et al., *J. Eur. Pharmacol.*, **265**(1–2), 1–7 (1994).
41. A. Caprioli, A. L. Markowska and D. S. Olton, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **50**(4), B 232–236 (1995).
42. G. Tagliatela, A. Caprioli, A. Giuliani, et al., *Exp. Gerontol.*, **31**(5), 577–587 (1996).
43. T. M. Hagen, R. T. Ingersoll, C. M. Werh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(16), 9562–9566 (1998).
44. M. Valoti, A. Benocci, K. Marazova, et al., *Pharmacol. Res.*, **34**(5–6), 219–224 (1996).
45. R. A. Howlett, M. L. Parolin, D. J. Dyck, et al., *Am. J. Physiol.*, **275**(2 Pt 2), R418–425 (1998).
46. И. А. Логвиненко, *Рос. нац. конгр. “Человек и лекарство”*, Москва (1995), с. 305.
47. M. M. Lolic, G. Fiskum and R. E. Rosental, *Ann. Emerg. Med.*, **29**(6), 758–765 (1997).
48. E. Dell’Anna, L. Iuvone, S. Calzolari, et al., *Neurosci Lett.*, **223**(3), 201–205 (1997).
49. M. Onofrij, T. Fulgente, D. Melchionda, et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, **15**(1), 9–15 (1995).
50. G. J. Moyle and M. Sandler, *Drug Saf.*, **19**(6), 481–494 (1998).
51. G. Famularo, S. Moretti, S. Marselini, et al., *AIDS*, **11**(2), 185–190 (1997).
52. R. Mazzocchio and A. Rossi, *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, **2**(1), 53–58 (1997).
53. R. Mazzocchio and A. Rossi, *Brain*, **120**(Pt 6), 991–1003 (1997).
54. L. J. Thal, A. Carta, W. R. Clarke, *Neurology*, **47**(3), 705–711 (1996).
55. J. O. Brooks, J. A. Yesavage, A. Carta, et al., *Int. Psychogeriatr.*, **10**(2) 193–203 (1998).
56. J. W. Pettegrew, W. E. Klunk, K. Panchalingam, et al., *Neurobiol. Aging*, **16**(1), 1–4 (1995).

Поступила 30.10.2001