



УДК 577.112.6

ПРОТЕИНАЗНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КАРНОЗИНА, ПИРРОЛИЛКАРНОЗИНА И САЛИЦИЛКАРНОЗИНА

© 2024 г. К. В. Шевченко^{*, #}, И. Ю. Нагаев^{*}, О. И. Куликова^{**}, С. Л. Стволинский^{**},
В. П. Шевченко^{*}, Н. Ф. Мясоедов^{*}

^{*} Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт”),
Россия, 123182 Москва, пл. Курчатова, 2

^{**} ФГБНУ “Научный центр неврологии” (ФГБНУ НЦН),
Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 11.08.2023 г.

Проведена оценка устойчивости карнозина, пирролилкарнозина (ПК) и салицилкарнозина (СК) к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы В и У. Установлено, что протеолиз карнозина, ПК и СК под действием лейцинаминопептидазы не происходит. Карбоксипептидазы В и У, а также ферментная система плазмы крови и плазматических мембран клеток головного мозга крысы в разной степени деградировали пептиды, содержащие β-аланиловый, N-пирролиловый и N-салициловый фрагменты. Во всех случаях образовывался гистидин. Образования пиррола или салициловой кислоты не происходило. Установлено, что карнозин, ПК и СК проявляли высокую устойчивость к действию amino- и карбоксипептидаз в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: дипептиды, пептидазы, протеолиз, карнозин, пирролилкарнозин, салицилкарнозин

DOI: 10.31857/S0132342324020042, **EDN:** ONHXKY

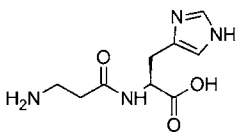
ВВЕДЕНИЕ

Биоактивные белки и пептиды с различными биологическими свойствами рассматриваются как новые терапевтические молекулы для применения в медицине [1]. Среди них значительный интерес привлекает группа гистидин-содержащих дипептидов (ГСД), из которых наиболее изучен β-аланил-L-гистидин (карнозин). Карнозин характеризуется как прямым, так и непрямым антиоксидантным действием, обладает свойствами молекулярного шаперона и тканевого рН-буфера, хелатора ионов двухвалентных металлов [2]. Имеются ограниченные данные о протективном действии карнозина при диабетических осложнениях, катарактогенезе, нейродегенеративных заболеваниях, раке, возраст-зависимых патологиях [3]. Однако широкого распространения в клинической практике карнозин и другие ГСД не получили, что обусловлено их быстрым выведением из организма благодаря активному гидролизу специфическими пептидазами – карнозиназами: CN1 (ЕС 3.4.13.20 – сывороточная карнозиназа человека) и CN2 (ЕС 3.4.13.18 – тканевая карнозиназа человека) [4].

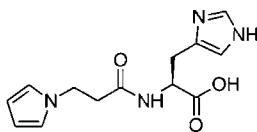
Были синтезированы новые производные карнозина: N-салицилкарнозин ([3-(N-салицил)-пропаноил-L-гистидин], СК) [5] и N-пирролилкарнозин ([3-(N-пирролил)-пропаноил-L-гистидин], ПК) [6], обладающие антиоксидантным, цитопротекторным и нейропротекторным действием (схема 1).

Сокращения: ПК – пирролилкарнозин; СК – салицилкарнозин; ГСД – гистидин-содержащие дипептиды; МФМК – микросомальная фракция мозга крысы; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

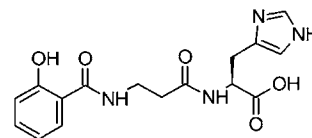
[#]Автор для связи: (тел.: +7 (499)196-02-16; эл. почта: ATCarma@mail.ru).



Карнозин (β -аланил-L-гистидин)



ПК [3-(*N*-пирролил)-пропаноил-L-гистидин]



СК [3-(*N*-салицил)-пропаноил-L-гистидин]

Схема 1. Структурные формулы карнозина (β -аланил-L-гистидина), пирролилкарнозина ([3-(*N*-пирролил)-пропаноил-L-гистидина]) и салицилкарнозина ([3-(*N*-салицил)-пропаноил-L-гистидина]).

Выбор салициловой кислоты и пиррола для получения конъюгатов с карнозином был обусловлен широким применением этих соединений и их производных в качестве эффективных лекарственных препаратов с широким спектром действия [7, 8].

Ранее по методу Pegova et al. [9] была исследована устойчивость карнозина, ПК и СК к действию сывороточной карнозины. Показано, что ПК и СК более устойчивы к гидролизу по сравнению с карнозином, который полностью деградирует в течение 3 ч. За это время содержание ПК и СК уменьшалось на несколько процентов [5, 6].

При гидролизе дипептидов под воздействием как амино-, так и карбоксипептидаз образуются аналогичные продукты: гистидин и модифицированный β -аланиловый фрагмент, поэтому необходимо было установить не только устойчивость карнозина, ПК и СК в этих условиях, но и основной путь их деградации, а также выяснить, как разные модификации *N*-концевой аминокислоты влияют на гидролиз связи между гистидином и модифицированным β -аланиловым фрагментом молекулы пептида.

Таким образом, целью данной работы была оценка устойчивости карнозина, ПК и СК к действию очищенных амино- и карбоксипептидаз, а также ферментной системы плазмы крови и микросомальной фракции мозга крысы (МФМК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептиды (карнозин, ПК и СК) инкубировали в фосфатно-солевом буфере в присутствии микросомальной лейцинаминопептидазы (ЕС 3.4.11.2),

карбоксипептидазы В (ЕС 3.4.17.2), карбоксипептидазы У (ЕС 3.4.16.1), ферментной системы плазмы крови и МФМК. Такой набор пептидаз использовали при оценке устойчивости разных пептидов [10]. Этим методом тестируют, как правило, пептиды до 10 а.о.: 5-оксо-Pro-His-Pro-NH₂, 5-оксо-Pro-Arg-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu, His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro, семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и его аналоги [11].

Эксперименты с высокоспецифичным ферментом лейцинаминопептидазой показали, что данный фермент неэффективен для протеолиза карнозина, ПК и СК. Эти соединения оказались устойчивы к действию лейцинаминопептидазы в течение нескольких суток.

Оценка протеолиза карнозина, ПК и СК под действием карбоксипептидаз В и У приведена в табл. 1. Для оценки воспроизводимости были проведены три серии экспериментов. Доверительный интервал рассчитывали, исходя из доверительной вероятности более 0.95.

Как видно из табл. 1, карбоксипептидазы В и У в разной степени гидролизовали пептиды, содержащие β -аланиловый, *N*-пирролиловый и *N*-салициловый фрагменты.

В присутствии карбоксипептидазы У карнозин деградировал в наибольшей степени (после 120 ч в реакционной смеси присутствовал 31% карнозина). Устойчивость ПК и СК была практически одинаковой и в ~2 раза превышала устойчивость карнозина. Карнозин не подвергался гидролизу карбоксипептидазой В, в то время как ПК за 120 ч полностью распадался на гистидин и *N*-пирролиловую часть.

Таблица 1. Протеолиз дипептидов под действием карбоксипептидаз В и У

Пептид	Время, ч				
	1	2	24	50	120
Карбоксипептидаза У					
Карнозин	94.6 ± 1.3	90.9 ± 1.5	76.5 ± 1.7	59.0 ± 2.0	31.0 ± 3.0
ПК	99.1 ± 0.8	98.1 ± 0.7	95.6 ± 0.9	86.3 ± 1.6	74.0 ± 2.0
СК	99.3 ± 0.4	98.3 ± 0.6	93.4 ± 0.8	86.3 ± 1.2	72.4 ± 1.5
Карбоксипептидаза В					
Карнозин	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
ПК	94.1 ± 0.4	92.9 ± 1.6	42.8 ± 1.7	9.3 ± 1.2	0.0
СК	98.6 ± 0.6	96.2 ± 0.9	89.7 ± 0.6	74.2 ± 1.4	11.1 ± 1.1

Приведено остаточное содержание карнозина, ПК и СК в инкубационной смеси в % от исходного количества.

* Доверительный интервал подсчитан для серии из трех повторов, исходя из доверительной вероятности $p > 0.95$.

Более устойчивым по сравнению с ПК оказался СК (после 120 ч в реакционной смеси оставалось 11.1% СК).

Также была исследована устойчивость карнозина, ПК и СК в присутствии плазмы крови и МФМК (табл. 2). При анализе проб, полученных при работе с плазмой крови и МФМК, число повторных измерений увеличили до 5 раз.

Полученные данные показали, что в присутствии плазмы крови к завершению срока инкубации (к 120 ч) содержание карнозина в инкубационной среде оказалось значительно ниже, чем ПК и СК, как это наблюдалось и при использовании карбоксипептидазы У. Можно предположить, что гидролиз карнозина, ПК и СК в основном определяется действием такого рода карбоксипептидаз. В мозге крыс присутствует другой набор ферментов, который относительно быстро полностью гидролизует карнозин к 24 ч инкубации, в то время как ПК полностью гидролизировался только к 120 ч, а СК оказался устойчив к действию этой ферментной системы. По-видимому, пирролиловый и особенно салициловый фрагмент этих пептидов препятствуют протеазной активности ферментов МФМК.

Хромато-масс-спектрометрический анализ реакционных смесей показал, что среди продуктов ферментативного гидролиза содержатся 3-(*N*-пирролил)-пропионовая кислота и *N*-салицил-β-аланин, образующиеся при отщеплении гистидина от исходных ПК и СК (табл. 3). Их структура дополнительно под-

тверждается масс-спектрами фрагментации в условиях ионных соударений при 35 эВ. Образования пиррола или салициловой кислоты не происходило.

Таким образом, карнозин, ПК и СК проявляли высокую устойчивость к действию ферментных систем плазмы крови, отдельных амино- и карбоксипептидаз в экспериментах *in vitro* (табл. 1, 2). Присутствие карнозина, ПК и СК в реакционной среде обнаруживалось в течение нескольких суток. В присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК гидролиз карнозина происходит эффективней, чем ПК и СК (табл. 2). В результате гидролиза происходит отщепление гистидина, при этом образования пиррола или салициловой кислоты не происходит.

Полученные результаты в совокупности с ранее опубликованными нами данными указывают на перспективность модификации природных гистидинсодержащих дипептидов по *N*-концевой аминокислоте (β-аланину) с целью повышения биодоступности таких соединений и открывают путь дальнейшим исследованиям возможности их применения в клинической практике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и ферменты. Лейцинаминопептидаза (ЕС 3.4.11.2, Sigma-Aldrich, США, тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед. акт./мг), карбоксипептидаза У (ЕС 3.4.16.1, Sigma-Aldrich, из хлебо-

Таблица 2. Протеолиз дипептидов под действием ферментной системы плазмы крови и МФМК

Пептид	Время, ч				
	1	2	24	50	120
Ферментная система плазмы крови					
Карнозин	100.0	100.0	94.0 ± 0.7	78.2 ± 1.4	61.0 ± 2.5
ПК	100.0	100.0	100.0	98.0 ± 1.6	90.0 ± 1.8
СК	100.0	100.0	100.0	96.0 ± 1.5	87.0 ± 1.8
Ферментная система МФМК					
Карнозин	74.3 ± 1.7	65.4 ± 1.9	0.0	0.0	0.0
ПК	100.0	100.0	52.9 ± 1.6	41.2 ± 2.2	0.0
СК	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Приведено содержание карнозина, ПК и СК в инкубационной смеси в % от исходного количества.

* Доверительный интервал подсчитан для серии из пяти повторов, исходя из доверительной вероятности $p > 0.95$.

пекарных дрожжей, 17 ед. акт./мг), карбоксипептидаза В (ЕС 3.4.17.2, Sigma-Aldrich, из поджелудочной железы свиньи, 70 ед. акт./мг), необходимые реактивы – коммерческие препараты. Карнозин, ПК и СК предоставлены ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Россия.

Анализ состава продуктов протеолиза исследуемых соединений. Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 (Институт хроматографии “Эконова”, Россия) с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм) в градиенте метанола в буфере (0.2 М LiClO₄ + 0.005 М HClO₄, pH 2.24) в течение 12 мин при 35°C. Длина волны – 210 нм, скорость подачи элюента – 0.2 мл/мин. Хроматографию проводили в линейном градиенте концентрации метанола 0–20% (система 1, карнозин), 5–20% (система 2, ПК) и 5–100% (система 3, СК). Время удерживания карнозина – 1.49 мин, ПК – 6.80 мин, СК – 5.74 мин.

Масс-спектрометрические данные исходных соединений и продуктов их протеолиза получали на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ (табл. 3).

На рис. 1 приведена хроматограмма реакционной смеси продуктов гидролиза ПК в присутствии карбоксипептидазы В.

Устойчивость карнозина и его производных в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и В. Условия протеолиза под действием лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз подбирали по методике Regova et al. [9], используя в качестве репера семакс (Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Россия). Субстрат-ферментное соотношение в случае лейцин-

Таблица 3. Хромато-масс-спектрометрический анализ исходных пептидов и их метаболитов

Вещество	τ, мин	$[M + H]^+$ _{расч}	$[M + H]^+$ _{эксп}
Карнозин	1.49*	227.11	227.2
ПК	6.80**	276.13	277.2
3-(N-пирролил)-пропионовая кислота	9.65**	140.07	140.1
СК	5.74***	347.14	347.1
N-Салицил-β-аланин	6.88***	210.07	210.2

$[M + H]^+$ _{расч} – расчетное значение; $[M + H]^+$ _{эксп} – значение, полученное из масс-спектра (разрешение $m/z \pm 0.2$ Да).

* Система 1; ** система 2; *** система 3.

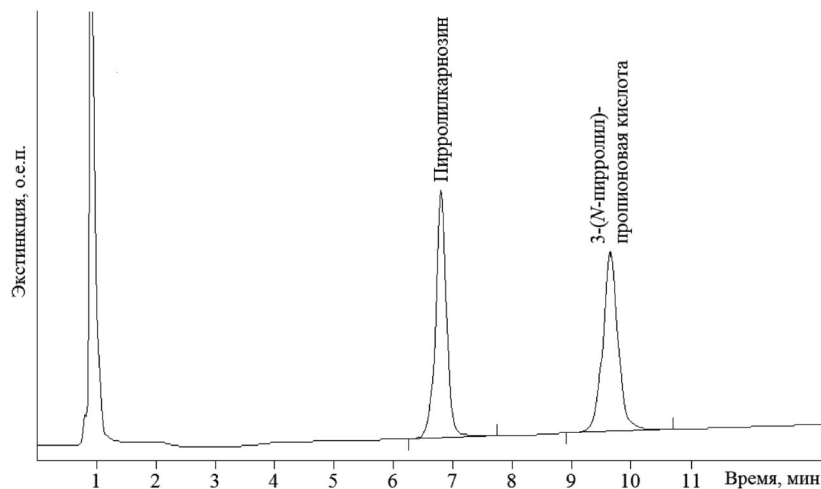


Рис. 1. Хроматограмма реакционной смеси ПК в присутствии карбоксипептидазы В через 24 ч инкубации. ПК (время удерживания 6.80 мин), $[M + H]^+ - 277.2$, метаболит (время удерживания 9.65 мин), $[M + H]^+ - 140.1$.

аминопептидазы составляло 1 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы Y – 0.092 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы В – 0.022 мкмоль/ед. акт.

Протеолиз карнозина и его производных проводили по следующей методике. К раствору 0.5 мкмоль субстрата в 280 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄, pH 7.4) добавляли 0.5 ед. акт. лейцинаминопептидазы, или 5.44 ед. акт. карбоксипептидазы Y, или 22.4 ед. акт. карбоксипептидазы В в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая алиquotы по 25 мкл через определенные промежутки времени. Протеолиз останавливали добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Пробы, отобранные через заданные промежутки времени, анализировали на хроматографе Милихром А-02 (табл. 1).

Выделение плазматических мембран клеток головного мозга крысы. Выделение плазматических мембран проводили при 4°C. Взрослых крыс (самцы, линия Wistar, масса 220 г, 8 крыс, филиал “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России) усыпляли диэтиловым эфиром и декапитировали. Кровь собирали из туловища крысы и извлекали головной мозг. Мозг всех 8 крыс промывали холодным фосфатно-солевым

буфером. Полученные образцы гомогенизировали в 80 мл буфера А (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 при 4°C, 0.32 M сахараза, 1 mM EDTA, 1 mM бензамидин, 0.1 mM PMSF) в гомогенизаторе тефлон–стекло. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, осадок отбрасывали, а супернатант повторно центрифугировали при 30 000 g в течение 40 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а супернатант разбавляли в 40 мл буфера А, переносили в чистую пробирку и осаждали мембраны центрифугированием при 40 000 g в течение 40 мин, супернатант удаляли. Остатки супернатанта удаляли, дважды промывая пробирку 20 мл буфера А. По окончании промывок осадок суспендировали в 10 мл буфера А2 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 при 4°C, 0.22 M сахараза), разделяли на порции по 1 мл и замораживали в жидком азоте. Хранили в кельвинаторе при –80°C.

Для получения плазмы крови собранную после декапитации кровь помещали в пробирку, содержащую 20 мкл гепарина (5000 Е/мл), и центрифугировали при комнатной температуре 15 мин при 1500 g. Плазму крови (верхний слой) аккуратно отбирали, перемешивали и разливали в охлажденные микропробирки. Хранили в кельвинаторе при –80°C.

Устойчивость карнозина и его производных в присутствии микросомальной фракции мозга крысы и плазмы крови. Биологическую активность ферментной системы плазмы крови и МФМК тестировали по методике Regova et al. [9]. Подбирали такое количество плазмы крови или МФМК, которое приводило к деградации семакса на 70–80% в течение 1 ч. Протеолиз исследуемых пептидов проводили по следующей методике: к раствору 0.5 мкмоль пептида, приготовленного на 100 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na₃PO₄, pH 7.4), добавляли 323 мкл раствора плазматических мембран клеток головного мозга крыс (концентрация белка 8.6 мг/мл) или 256 мкл плазмы крови (концентрация белка 70 мг/мл). Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 60 мкл через определенные промежутки времени. Протеолиз останавливали добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола.

Полученные пробы (120 мкл) наносили на патрон, упакованный 20 мг обращенной фазы Lichogrep RP-18, уравновешенной в смеси метанол–вода (1 : 1), с последующим элюированием метанолом с 0.1% трифторуксусной кислоты. При этом на обращенной фазе осаждались высокомолекулярные продукты, а метанольный раствор содержал искомую пептидную фракцию. В результате при анализе реакционных смесей хроматографическая колонка не дезактивировалась. Собранные метанольные растворы упаривали и растворяли в 200 мкл воды. Анализ продуктов реакции проводили методом ВЭЖХ (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что карнозин, ПК и СК проявляют высокую устойчивость к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз В и У, а также к ферментным системам МФМК и плазмы крови в экспериментах *in vitro*. Эти соединения оказались устойчивы к действию лейцинаминопептидазы в течение нескольких суток. В присутствии карбоксипептидазы У карнозин деградировал в наибольшей

степени. Устойчивость ПК и СК была практически одинаковой и в ~2 раза превышала устойчивость карнозина. Карнозин не подвергался гидролизу карбоксипептидазой В, в то время как ПК и СК за 120 ч деградировали на 100 и 89% соответственно. В присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК гидролиз карнозина происходил эффективней, чем ПК и СК. Среди продуктов ферментативного гидролиза содержались 3-(*N*-пирролил)-пропионовая кислота и *N*-салицил-β-аланин, образовавшиеся при отщеплении гистидина от исходных ПК и СК. Образование пиррола или салициловой кислоты не происходило.

Полученные результаты показали, что, во-первых, устойчивость карнозина, ПК и СК к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз В и У высокая. Во-вторых, синтезированные производные карнозина (ПК и СК) менее подвержены протеолизу в присутствии ферментной системы плазмы крови и МФМК, чем исходный карнозин. При этом из производных карнозина (ПК и СК) не образуются салициловая кислота и пиррол. Таким образом, ПК и СК могут рассматриваться как возможные кандидаты для применения в клинической практике.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания по плану НИОКР НИЦ “Курчатовский институт” и в рамках темы №1021052806528-6-1.6.4;3.1.1;3.1.9;3.1.8;3.2.25 “Фундаментальные аспекты нейропластичности в рамках модели трансляционной неврологии” Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научный центр неврологии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Экспериментальные процедуры для получения тканей из крыс были одобрены местным комитетом по этике Общества экспериментального ухода за животными (НИЦ “Курчатовский институт”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agyei D., Ahmed I., Akram Z., Iqbal H.M.N., Danquah M.K.* // *Protein Pept. Lett.* 2017. V. 24. P. 94–101.
<https://doi.org/10.2174/0929866523666161222150444>
2. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. P. 1803–1845.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>
3. *Hipkiss A.R.* // In: *Advances in Food and Nutrition Research* / Ed. Taylor S.L. Burlington: Academic Press, 2009. V. 57. P. 87–154.
4. *Bellia F., Vecchio G., Rizzarelli E.* // *Molecules.* 2014. V. 19. P. 2299–2329.
<https://doi.org/10.3390/molecules19022299>
5. *Танащян М.М., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мигулин В.А., Шабалина А.А., Трубицына И.Е., Лопачев А.В., Куликова О.И., Абаимов Д.А.* // Патент RU 2694061 С1, опубл. 09.07.2019.
6. *Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Мигулин В.А., Лопачев А.В., Хуторова А.В., Куликова О.И., Музычук О.А., Абаимов Д.А.* // Патент RU 2777391 С1, опубл. 03.08.2022.
7. *Baltazar M.T., Dinis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Bastos M.L., Carvalho F.* // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 3252–3264.
<https://doi.org/10.2174/092986711796391552>
8. *Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhimana S., Sharma P.* // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 15233–15266.
<https://doi.org/10.1039/C4RA15710A>
9. *Pegova A., Abe H., Boldyrev A.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2000. V. 127. P. 443–446.
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00279-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00279-0)
10. *Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф.* // *Биомед. химия.* 2019. Т. 65. № 3. С. 180–201. [*Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2019. V. 13. P. 179–201.]
<https://doi.org/10.1134/S1990750819030089>
11. *Овчинников Ю.А.* // *Биоорганическая химия.* М.: Просвещение, 1987.

Proteinase Resistance of Carnosine, Pyrrolylcarnosine, and Salicylcarnosine

K. V. Shevchenko^{*,#}, I. Yu. Nagaev^{*}, O. I. Kulikova^{}, S. L. Stvolinsky^{**},
V. P. Shevchenko^{*}, and N. F. Myasoedov^{*}**

[#] Phone: 8 (499)196-02-16; e-mail: ATCarma@mail.ru

^{*} National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute”),
pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

^{**} Research Center of Neurology (RCN), Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367 Russia

The stability of carnosine, pyrrolylcarnosine (PC) and salicylcarnosine (SC) to the action of leucine aminopeptidase, carboxypeptidases B and Y was evaluated. It was found that proteolysis of carnosine, PC and SC under the action of leucine aminopeptidase does not occur. Carboxypeptidases B and Y, as well as the enzyme system of blood plasma and plasma membranes of rat brain cells, degraded peptides containing β -alanyl, *N*-pyrrolyl, *N*-salicylic fragments to varying degrees. In all cases, histidine is formed. The formation of pyrrole or salicylic acid does not occur. It was found that carnosine, PC and SC showed high stability to the action of amino- and carboxypeptidases in *in vitro* experiments.

Keywords: dipeptides, peptidases, proteolysis, carnosine, pyrrolylcarnosine, salicylcarnosine