

К. В. Шевченко, Л. А. Андреева, И. Ю. Нагаев, В. П. Шевченко, Н. Ф. Мясоедов

## УСТОЙЧИВОСТЬ 5-ОХО-PRO-ARG-PRO, 5-ОХО-PRO-HIS-PRO-GLY-PRONH<sub>2</sub> И PHE-PRO-LEU-PRO-ALA В УСЛОВИЯХ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ *in vitro*

ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН),  
Россия, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2; факс (499)196-02-21;  
e-mail: ATRegister@mail.ru

Проведено сравнение протеолиза 5-охо-Pro-Arg-Pro, 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala в присутствии лейцинаминопептидазы, карбоксипептидаз Y и B. Оказалось, что 5-охо-Pro-Arg-Pro устойчив в присутствии пептидаз. Только карбоксипептидаза Y в течение 26 ч гидролизует этот пептид, да и то в пределах 50 %. 5-Охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> устойчив в присутствии лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y, в то время как Phe-Pro-Leu-Pro-Ala устойчив только в присутствии карбоксипептидазы B. В присутствии назальной слизи, крови и микросомальной фракции мозга крысы наиболее устойчивым оказался 5-охо-Pro-Arg-Pro. Наиболее эффективный гидролиз всех пептидов наблюдался под действием ферментной системы крови. Обнаружено и идентифицировано несколько продуктов метаболизма перечисленных выше пептидов. На основании полученных данных сделаны выводы о главных направлениях гидролиза 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala, что позволяет предположить набор пептидов, который может образоваться в экспериментах *in vivo*.

**Ключевые слова:** аналоги тиролиберина; лейцинаминопептидаза; карбоксипептидаза; плазматические мембраны; продукты метаболизма.

Пептид тиролиберин является одним из первых применяемых в клинической практике регуляторных пептидов [1 – 3]. Лекарственные препараты на основе этого нейропептида оказывают непродолжительное антидепрессивное и психостимулирующее действие, улучшают мозговое кровообращение, ослабляют действие алкоголя, барбитуратов, нейролептиков и наркотических средств, участвуют в контроле множества нервных и психических функций, среди них — обучение, память, сон и т.д. [4 – 10]. Довольно много известно об анальгетических эффектах тиролиберина [11]. Короткие пептиды, в состав которых входят 5-охо-Pro, аланин или лейцин также проявляют высокую биологическую активность.

Пептиды, содержащие аминокислоты лейцин и аланин, снижают уровень сахара крови. Например, установлено, что Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala оказывают нормогликемическое действие при повышенном уровне сахара у животных. Кроме этого, показано, что Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala способны улучшать параметры жирового обмена в условиях метаболического синдрома. И эти пептиды могут быть отнесены к препаратам гиполипидемического действия, блокирующим накопление новых жировых отложений в организме в условиях развития метаболического синдрома [12].

Из большого числа синтезированных пептидов, в состав которых входили 5-охо-Pro, аланин или лейцин, были выбраны в качестве перспективных 5-охо-Pro-Arg-Pro, 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala. В результате различных тестов установлено, что при интраназальном введении данные пептиды оказывали определенное влияние на устойчи-

вость к гипобарической гипоксии, а также на поведение животных в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» [13].

Целью данной работы является изучение устойчивости 5-охо-Pro-Arg-Pro, 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala как под действием индивидуальных протеаз, так и ферментных систем назальной слизи, крови и микросомальной фракции мозга крысы (МФМК), выделенных из крыс. Это исследование позволит учесть возможность появления при протеолизе метаболитов, обладающих собственной биологической активностью.

### Экспериментальная часть

Лейцинаминопептидаза (К. Ф. 3.4.11.2), карбоксипептидаза Y (К. Ф. 3.4.16.1) и карбоксипептидаза B (К. Ф. 3.4.17.2), а также необходимые реактивы — коммерческие препараты. Назальная слизь (5,2 мг белка/мл), МФМК (8,6 мг белка/мл) и кровь (31 мг белка/мл) получены из самцов крыс Wistar [14, 15]. Работы *in vitro* проводили по методикам [14, 15]. Разброс значений при использовании этих методик в основном связан с точностью определения содержания пептидов хроматографическими методами. Обычная точность определения  $\pm 5\%$ . Таким образом, значения в табл. 2 – 4 могут отличаться от приведенных в этих пределах и не могут исказить наблюдаемые закономерности.

**Анализ реакционных смесей** проводили на хроматографе Милихром-А02, длины волн (нм): 200, 210, 220, 230, 240 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C<sub>18</sub> AQ DB-2003 (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм), в

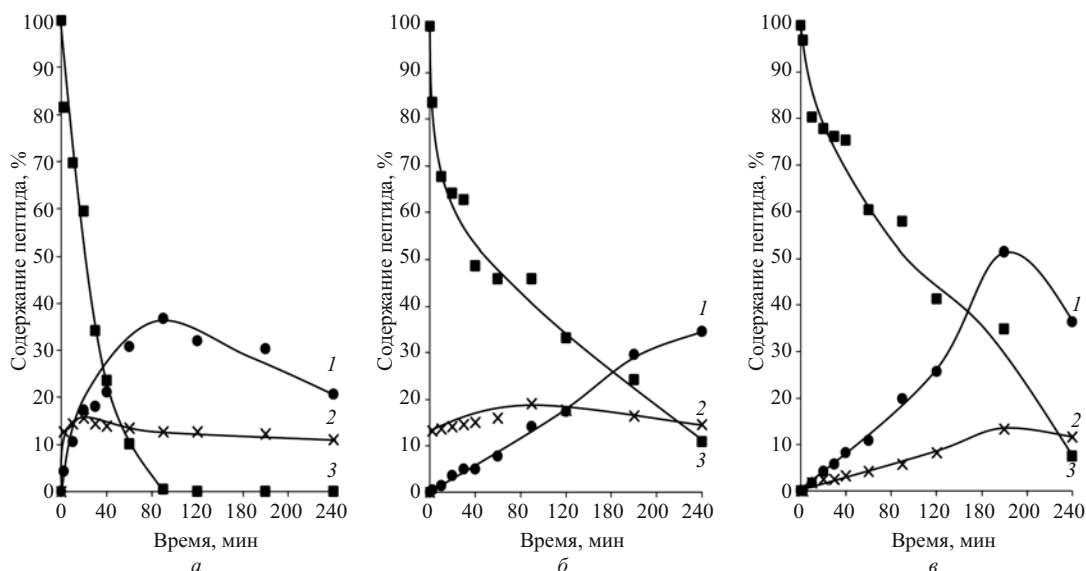


Рис. 1. Образование метаболитов при протеолизе 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> (3) в присутствии ферментной системы крови (а), назальной слизи (б) и МФМК (в); 1 — 5-охо-Pro-His-Pro; 2 — His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub>.

градиенте метанола и буфера (0,2 М LiClO<sub>4</sub> + 0,005 М HClO<sub>4</sub>, pH 2,24) в течение 12 мин при температуре 35 °С. Анализ Phe-Pro-Leu-Pro-Ala проводили, увеличивая концентрацию метанола от 5 до 100 % (система 1). Анализ 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и 5-охо-Pro-Arg-Pro проводили, увеличивая концентрацию метанола от 1 до 30 % (система 2). Скорость подачи элюента — 0,2 мл/мин, время удерживания 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> — 7,98 мин, 5-охо-Pro-Arg-Pro — 7,93 мин и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala — 8,31 мин.

Анализ пептидов с использованием масс-спектрометрических данных проводили на приборе LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в 0,1 % уксусной кислоте и дальнейшей фрагментацией молекулярного пика в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ (табл. 1).

#### Методика проведения протеолиза пептидов под действием лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы Y и карбоксипептидазы B

При использовании лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз условия протеолиза обрабатывали, исследуя деградацию исследуемых пептидов при разных соотношениях субстрата и фермента. Подбор условий основывался на том, что за время проведения экспериментов содержание самого лабильного в присутствии данного фермента пептида падало до значений, близких к нулевым. Оптимальным фермент-субстратным соотношением в случае лейцинаминопептидазы оказалось соотношение 1,27 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы Y — 0,022 мкмоль/ед. акт., в случае карбоксипептидазы B — 0,0025 мкмоль/ед. акт.

**Протеолиз пептидов проводили по следующей методике.** К раствору 0,21 мкмоль пептида в 120 мкл фосфатно-солевого буфера (27,4 мМ NaCl, 0,4 мМ KCl, 2 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в 100 мл H<sub>2</sub>O, pH 7,4) добавляли

0,17 ед. акт. лейцинаминопептидазы или 9,45 ед. акт. карбоксипептидазы Y или 87,52 ед. акт. карбоксипептидазы B в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30 °С, отбирая аликвоты по 30 мкл через определенные промежутки времени. Остановка протеолиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола.

**Выделение биоматериала.** Биоматериал выделяли из 10 взрослых крыс линии Wistar. Назальную слизь смывали фосфатно-солевым буфером с косточек перегородки носа крыс. Кровь собирали из туловища крыс в пробирку, содержащую 200 мкл гепарина (5000 Е/мл). Выделение мембран мозга крыс проводили при температуре 4 °С. Мозг крыс гомогенизировали в буфере (10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 0,32 М сахараза, 1 мМ EDTA, 1 мМ бензамидин, 0,1 М фенилметилсульфонилфторид). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g, осадок повторно гомогенизировали в том же буфере и центрифугировали. Супернатанты объединяли, подвергали центрифугированию при 12000 g в течение 25 мин. Осадок суспендировали в том же буфере и хранили в жидком азоте.

Таблица 1  
Хроматомасс-спектрометрический анализ пептидов

Пептид	Время удерживания, мин	[M + 1] <sup>+</sup>
5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	7,98**	517
5-охо-Pro-His-Pro	6,81**	364
His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	2,26**	407
Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	8,31*	544
Leu-Pro-Ala	4,44*	300
Pro-Leu-Pro-Ala	5,27*	397
Phe-Pro-Leu-Pro	8,61*	473
5-охо-Pro-Arg-Pro	7,93**	383

\* Система 1; \*\* система 2.

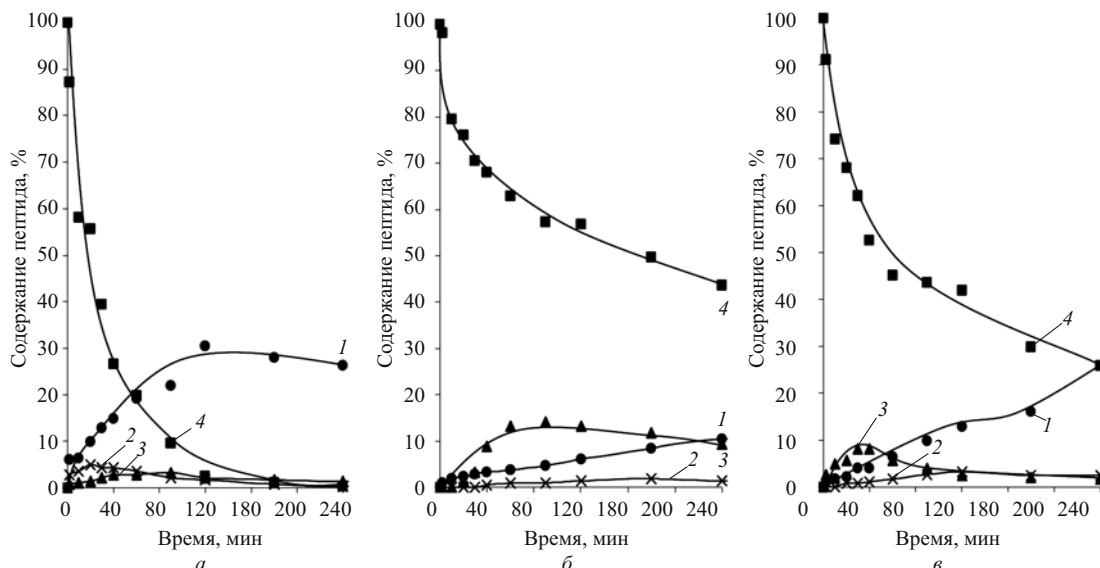


Рис. 2. Образование метаболитов при протеолизе Phe-Pro-Leu-Pro-Ala (4) в присутствии ферментной системы крови (а), назальной слизи (б) и МФМК (в); 1 — Leu-Pro-Ala; 2 — Pro-Leu-Pro-Ala; 3 — Phe-Pro-Leu-Pro.

Концентрацию белка в образцах назальной слизи, МФМК и крови определяли по методу Хартри — Лоури. Концентрация белка составила 5,2, 8,6 и 31 мг на 1 мл полученного экстракта назальной слизи, МФМК и крови соответственно. Оптимизацию фермент-субстратного соотношения и в этом случае проводили по тому же принципу, что и при работе с коммерческими ферментами. Это соотношение подбирали таким образом, чтобы за время проведения экспериментов содержание самого лабильного в присутствии данного фермента пептида падало до значений, близких к нулевым.

**Инкубация пептидов в присутствии биологических препаратов.** Протеолиз пептидов проводили по следующей методике. К раствору 0,37 мкмоль пептида добавляли 600 мкл экстракта назальной слизи (5,2 мг белка/мл) или 200 мкл (8,6 мг белка/мл) МФМК или 436 мкл крови (31 мг белка/мл). Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30 °С, отбирая аликвоты по 50 мкл через определенные промежутки времени. Полученные пробы очищали твердофазной экстракцией на обращенной фазе, суть кото-

рой заключалась в нанесении пептидной фракции на патрон, упакованный обращенной фазой Lichroprep RP-18, с последующим элюированием пептидов смесью метанол — вода (4:1) с 0,1 % TFA. Далее смесь упаривали и растворяли в 200 мкл смеси метанол — вода (10:90). Анализ смеси проводили методом ВЭЖХ.

#### Результаты и их обсуждение

Данные, полученные при анализе реакционных смесей после инкубации 5-охо-Pro-Arg-Pro, 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala в присутствии лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y и B, позволили изучить кинетику изменения содержания этих пептидов *in vitro* (табл. 2) и идентифицировать образующиеся из них метаболиты.

Как видно из приведенных данных, пептиды, в состав которых входит N-концевой 5-охо-Pro, оказались устойчивы в присутствии лейцинаминопептидазы, а Phe-Pro-Leu-Pro-Ala за 1 сут полностью деградировал. Устойчивость пептидов в присутствии различных кар-

Устойчивость пептидов в присутствии лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y и B

Таблица 2

Фермент	Пептид	Время, мин		
		2	30	1560
Лейцинаминопептидаза	5-охо-Pro-Arg-Pro	100	100	100
	5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	100	100	100
	Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	100	88,6 ± 3,2	0
Карбоксипептидаза Y	5-охо-Pro-Arg-Pro	100	99,0 ± 0,8	45,7 ± 1,6
	5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	100	100	100
	Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	100	22,8 ± 0,6	0
Карбоксипептидаза B	5-охо-Pro-Arg-Pro	100	100	100
	5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	100	95,7 ± 1,6	1,2 ± 0,04
	Phe-Pro-Leu-Pro-Ala	94,5 ± 1,1	93,5 ± 1,5	58,4 ± 1,1

боксипептидаз заметно отличалась. Карбоксипептидаза Y быстро гидролизовала Phe-Pro-Leu-Pro-Ala, заметно медленнее 5-охо-Pro-Arg-Pro, а 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> оказался устойчивым в этих условиях. Иной характер устойчивости пептидов наблюдался в присутствии карбоксипептидазы B. Наиболее подвержен гидролизу оказался 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub>, менее чем на 50 % деградировал Phe-Pro-Leu-Pro-Ala, а 5-охо-Pro-Arg-Pro оказался устойчивым в этих условиях.

В качестве продуктов гидролиза в присутствии перечисленных пептидаз были выделены и охарактеризованы следующие. Из Phe-Pro-Leu-Pro-Ala идентифицированы Pro-Leu-Pro-Ala, Leu-Pro-Ala, Phe-Pro-Leu-Pro. По-видимому, гидролиз дипептидов, которые образуются из 5-охо-Pro-Arg-Pro, происходит значительно быстрее, чем их образование из исходного пептида. Поэтому их накопление в инкубационной среде оказывается недостаточным для идентификации. Основным продуктом, который образуется из 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> является 5-охо-Pro-His-Pro.

Высокая устойчивость 5-охо-Pro-Arg-Pro наблюдалась и в присутствии назальной слизи, крови и МФМК (табл. 3).

За 4 ч гидролиз 5-охо-Pro-Arg-Pro проходил лишь на 15 – 25 %. Ферментная система крови в большей степени катализировала протеолиз этого пептида. В присутствии назальной слизи и МФМК деградация 5-охо-Pro-Arg-Pro примерно одинакова.

Ферментная система в крови в случае 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub>, и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala также оказалась наиболее эффективным катализатором их гидролиза (рис. 1,2). При этом относительно 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> устойчивость Phe-Pro-Leu-Pro-Ala оказалась выше.

Таким образом, можно ожидать, что интраназальное введение этих пептидов окажется более эффективным в плане попадания этих пептидов в ткани мозга.

Как видно из приведенных данных, гидролиз 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala происходит как с C-, так и с N-конца (рис. 1, 2).

И в крови, и в назальной слизи, и в МФМК основным метаболитом при гидролизе 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> был 5-охо-Pro-His-Pro, а при гидролизе Phe-Pro-Leu-Pro-Ala соответственно Leu-Pro-Ala. Можно отметить, что и при гидролизе тиролиберина устойчивым в этих условиях также был 5-охо-Pro-His-Pro. His-Pro-GlyProNH<sub>2</sub> в крови более устойчив, чем 5-охо-Pro-His-Pro. За 48 ч содержание His-Pro-

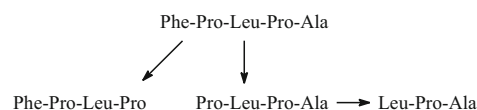
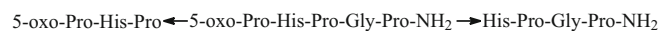
Gly-ProNH<sub>2</sub> в крови падает на 30 – 35 %, а 5-охо-Pro-His-Pro — практически до нуля. Leu-Pro-Ala в крови устойчив, за 48 ч его содержание падает на 20 %, а содержание Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro — на 85 – 95 %, что близко к нулевым значениям.

В присутствии назальной слизи 5-охо-Pro-His-Pro образуется не только больше, но и его устойчивость оказывается выше, чем у His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub>. За 48 ч содержание 5-охо-Pro-His-Pro возрастает на 20 %, а содержание His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> падает на 40 %. За 48 ч содержание Leu-Pro-Ala в присутствии назальной слизи также возрастает (почти в 4 раза по сравнению 4-часовой точкой), в то время как содержание Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro становится близким к нулевым значениям.

В присутствии МФМК максимальные значения 5-охо-Pro-His-Pro и His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> достигаются через 3 ч, а через 48 ч они полностью гидролизуются. Как и в случае работы с назальной слизью, в присутствии МФМК за 48 ч содержание Leu-Pro-Ala возрастает (почти на 60 % по сравнению с 4-часовой точкой), в то время как Pro-Leu-Pro-Ala и Phe-Pro-Leu-Pro гидролизуются полностью.

На основании хроматомасс-спектрометрических данных оказалось возможным оценить, как меняется в присутствии ферментной системы крови, назальной слизи и МФМК содержание метаболитов в инкубационной среде, и определить их максимальные значения (табл. 4).

Приведенные данные также показывают, что основными метаболитами в случае 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> является 5-охо-Pro-His-Pro, в случае Phe-Pro-Leu-Pro-Ala — соответственно Leu-Pro-Ala. Совокупность всей полученной информации позволяет сделать выводы о направлении деградации 5-охо-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> и Phe-Pro-Leu-Pro-Ala под действием ферментативных систем, выделенных из организма крыс.



Прочность связи между 5-охо-Pro и His оказалась большей, чем между Pro и Gly-ProNH<sub>2</sub>. Вопрос о том, происходит ли постепенное отщепление сначала ProNH<sub>2</sub>, затем Gly или происходит сразу отщепление Gly-ProNH<sub>2</sub>, остается открытым, так как ни 5-охо-

Таблица 3

Устойчивость 5-охо-Pro-Arg-Pro в присутствии назальной слизи, крови и МФМК

Фермент	Время, мин									
	2	10	20	30	40	60	90	120	180	240
Назальная слизь	100	100	99,3 ± 0,7	93,7 ± 1,8	91,6 ± 1,7	90,7 ± 1,8	90,7 ± 2,0	90,3 ± 2,3	85,5 ± 1,8	81,5 ± 2,0
МФМК	100	99,7 ± 0,2	97,2 ± 1,5	91,1 ± 2,3	91,0 ± 2,5	90,8 ± 2,8	90,8 ± 2,6	89,5 ± 3,0	88,0 ± 3,2	85,2 ± 3,2
Кровь	100	93,6 ± 2,5	90,2 ± 1,9	85,8 ± 2,4	84,6 ± 1,5	84,0 ± 1,8	82,8 ± 2,1	79,9 ± 1,5	77,1 ± 1,5	74,8 ± 1,6

Таблица 4

**Максимальные значения метаболитов, образующихся под действием ферментных систем**

Метаболит	Кровь	Назальная слизь	МФМК
His-Pro-Gly-ProNH <sub>2</sub>	15,6 ± 0,7	19,1 ± 0,6	13,2 ± 0,2
5-охо-Pro-His-Pro	36,7 ± 0,8	41,5 ± 1,4	51,2 ± 1,2
Leu-Pro-Ala	30,5 ± 0,9	39,4 ± 1,1	37,9 ± 1,5
Pro-Leu-Pro-Ala	5,0 ± 0,2	1,9 ± 0,07	3,2 ± 0,1
Phe-Pro-Leu-Pro	3,2 ± 0,1	14,1 ± 0,4	8,1 ± 0,3

Pro-His-Pro-Gly, ни Gly-ProNH<sub>2</sub> обнаружить не удалось. Прочность связи между Pro и Ala оказалось большей, чем между Phe и Pro. А связь между Pro и Leu еще легче гидролизует. Поэтому содержание Pro-Leu-Pro-Ala в инкубационной среде измеряется единицами процентов. Возможность параллельно идущей реакции отщепления фрагмента Phe-Pro недоказуемо, так как в инкубационной среде этот дипептид не обнаружен.

Таким образом, полученные данные позволили определить набор основных метаболитов, содержание которых можно достоверно оценить при анализе биологических проб в экспериментах *in vivo*. В дальнейшем также планируется изучить биологическую активность метаболитов, обнаруженных при исследованиях *in vitro*.

Данная работа проводилась при частичной поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий”.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. A. A. Nikrodhanond, T. M. Ortiga-Carvalho, N. Shibusawa, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**(8), 5000 – 5007 (2006).
2. K. R. Vella, A. N. Hollenberg, *Endocrinology*, **150**(5), 2021 – 2023 (2009).
3. E. A. Nillni, K. A. Sevarino, *Endocrine Rev.*, **20**(5), 599 – 648, (1999).
4. А. Н. Смирнов, *Физиологическая эндокринология*, Гэотар-Медиа, Москва (2008).
5. A. J. Klecha, A. M. Genaro, G. Gorelik, et al., *J. Endocrinol.*, **189**(1), 45 – 55, (2006).
6. М. Г. Голубева, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 4, 61 – 66 (2010).
7. M. Salomao, X. An, X. Guo, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **103**(3), 643 – 648 (2006).
8. И. П. Ашмарин, Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова, *Вестник Рос. акад. мед. наук*, № 6, 50 – 57 (1996).
9. J. Valles, M. T. Santos, J. Aznar, et al., *Blood*, **78**(1), 154 – 162 (1991).
10. Y. Sun, X. Lu, M. C. Gershengorn, *J. Mol. Endocrinol.*, **30**(2), 87 – 97 (2003).
11. А. В. Харитонов, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (2001).
12. Л. А. Ляпина, М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган и др., *Известия РАН, Сер. биол.*, № 6, 634 – 644 (2015).
13. К. В. Шевченко, Л. А. Андреева, И. Ю. Нагаев, В. П. Шевченко, *6-я международная конференция “Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам”*, Мытищинский район, Московская область (2015), с. 64.
14. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, И. Ю. Нагаев и др., *Биоорганическая химия*, **39**(3), 320 – 325 (2013).
15. К. В. Шевченко, Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(2), 12 – 17 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(2), (2015).

Поступила 24.11.16

**STABILITY OF 5-OXO-PRO-ARG-PRO, 5-OXO-PRO-HIS-PRO-GLY-PRONH<sub>2</sub>, AND PHE-PRO-LEU-PRO-ALA UNDER CONDITIONS OF IN-VITRO EXPERIMENTS**

K. V. Shevchenko\*, L. A. Andreeva, I. Yu. Nagaev, V. P. Shevchenko, and N. F. Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia

\* e-mail: ATRegister@mail.ru

We have compared the proteolysis of 5-oxo-Pro-Arg-Pro, 5-oxo-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub>, and Phe-Pro-Leu-Pro-Ala peptides in the presence of leucine aminopeptidase and carboxypeptidases Y and B. It was found that 5-oxo-Pro-Arg-Pro was generally stable in the presence of peptidases. Only carboxypeptidase Y hydrolyzed this peptide for 26 h, but the degree of hydrolysis did not exceed 50%. 5-oxo-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> was stable in the presence of leucine aminopeptidase and carboxypeptidase Y, while Phe-Pro-Leu-Pro-Ala was stable to carboxypeptidase B only. In the presence of nasal mucus, blood serum, and microsomal fraction of rat brain, 5-oxo-Pro-Arg-Pro also proved to be the most stable peptide. The most effective hydrolysis of all peptides studied was observed under the action of the blood enzyme system. Some metabolites of these peptides were detected and identified. Certain conclusions on the hydrolysis pathways of 5-oxo-Pro-His-Pro-Gly-ProNH<sub>2</sub> and Phe-Pro-Leu-Pro-Ala are made, which suggest a set of peptides that can be formed during *in vivo* experiments.

**Keywords:** thyroliberin analogs; leucine aminopeptidase; carboxypeptidase; plasmatic membranes; products of metabolism.