

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

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ АЦИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРТОНИНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА РАМРА

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт" —
ИМГ), Россия, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2.

* e-mail: ATCarma@mail.ru

Синтезированы ацилированные лауриновой (LA) и олеиновой (OA) кислотой пептидные производные дофамина (DA) и серотонина (5-НТ, 5-гидрокситриптамин) LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-НТ, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-НТ. Разработан масс-спектрометрический метод оценки содержания производных дофамина и серотонина в фосфатно-солевом буфере (PBS Am-E404-100, pH 7,4). Показана возможность проникновения этих соединений через искусственные мембраны. Использование смеси этих соединений позволило создать ситуацию, при которой диффузия молекул производных дофамина и серотонина через мембрану происходила в результате конкурентных взаимодействий, что позволило достоверно определить, какие соединения в этой смеси легче проникали через искусственные мембраны. Оценка сравнительной проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) проводили методом РАМРА (parallel artificial membrane permeability assay). Установлено, что наиболее перспективными в плане преодоления ГЭБ являются ацилированные лауриновой кислотой производные — LA-Gly-Pro-5-НТ и LA-Gly-Pro-DA.

Ключевые слова: пептидные ацильные производные; дофамин; серотонин; РАМРА; искусственные мембраны.

Известно, что ацилпроизводные биогенных аминов более устойчивы в биологических средах и демонстрируют ряд новых свойств, что в дальнейшем даст возможность использовать их для лечения различных патологий. Например, показано ингибирующее влияние *N*-докозагексаеноилдофамина на развитие симптомов болезни Паркинсона, вызванных у мышей введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина [1]. Также установлено, что продукты деградации *N*-ацилдофаминов могут ингибировать различные мембранные оксидоредуктазы [2]. Ряд ацилпроизводных биогенных аминов являются эндогенными соединениями, которые обладают выраженным нейропротекторным эффектом [3, 4].

Очевидно, что влияние ацилированных производных физиологически активных веществ на ЦНС будет зависеть от проникновения их через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Показано, что многие пептиды и пептидсодержащие производные биологически активных соединений способны проникать через ГЭБ, используя лишь пассивную диффузию [5]. Поэтому есть возможность оценить сравнительную проницаемость через ГЭБ для серии ацилпроизводных биогенных аминов, используя метод РАМРА (parallel artificial membrane permeability assay). Этот метод основан на применении искусственно сконструированных клеточных мембран на основе додекана и смеси додекана с полярными липидами [6].

Цель данной работы — использование метода РАМРА для сравнения проницаемости через искусст-

венные мембраны ацилированных лауриновой (LA) и олеиновой (OA) кислотой пептидных производных дофамина (DA) и серотонина (5-НТ, 5-гидрокситриптамин) LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-НТ, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-НТ с целью выбора соединения, которое в дальнейшем будет использовано в экспериментах *in vivo*.

Экспериментальная часть

Реагенты и растворители — коммерческие препараты. В работе использовали липиды фирмы "Merck" (чистота 97–99 %). Синтез 1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилинозитфосфата проводили по методике [7]. Синтезированные соединения идентифицировали хроматографическим и масс-спектрометрическим методами.

Синтез LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-НТ, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-НТ

Раствор 1 ммоль лауриновой (LA) или олеиновой (OA) кислоты в 3 мл абсолютного бензола смешивали с 2,50 ммоль тионилхлорида. Раствор кипятили с обратным холодильником в течение 2,5 ч. Бензол и избыток тионилхлорида удаляли, остаток еще дважды упаривали с 5 мл абсолютного бензола. Хлорангидриды лауриновой и олеиновой кислот использовали без дополнительной очистки.

Раствор 0,4 ммоль метилового эфира дипептида Gly-Pro в 1 мл хлороформа обрабатывали при перемешивании 0,4 мл Et₃N и 0,35 ммоль хлорангидрида лау-

риновой или олеиновой кислот. Через 2 ч реакционную смесь обрабатывали метанолом, растворители удаляли.

Препаративную очистку OA-Gly-Pro-OMe и LA-Gly-Pro-OMe проводили с использованием колонки Reprosil pur C18aq (20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм), скорость подачи элюента 20 мл/мин, в системе MeOH–H₂O–AcOH–ТФУ (90:10:0.1:0,01). Выходы препаратов — 79 и 87 %, соответственно.

Метилловый эфир удаляли щелочным гидролизом. Раствор вещества в 4 мл метанола перемешивали в течение 7 ч с 0,5 мл 2 н. NaOH, подкисляли 1 н. HCl и упаривали. Остаток растворяли в 3 мл этилацетата и промывали водой до нейтрального pH. Раствор упаривали, лиофилизировали и использовали в дальнейшем без дополнительной очистки.

К раствору 0,1 ммоль LA-Gly-Pro (OA-Gly-Pro) и 0,2 ммоль *N*-оксисукцинимид в 5 мл сухого диоксана добавляли 0,2 ммоль дициклогексилкарбодиимида и перемешивали 5 ч при 23 °С. Затем растворитель удаляли. Остаток растворяли в 2 мл этанола, прибавляли 0,3 мл триэтиламина и 0,12 ммоль дофамина или серотонина. Растворы перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Соединения очищали, как описано выше. Выход препаратов — 40 – 45 %.

Анализ проводили на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL-120 – 5-C18 AQ (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм), скорость подачи элюента 0,2 мл/мин, температура 35 °С, длина волны 210 нм, элюент А — 0,1 % уксусная кислота, Б — метанол. Время удерживания OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-НТ — 7,80 и 7,76 мин (градиент 70 – 100 % Б за 12,5 мин); LA-Gly-Pro-DA 9,31 мин (30 – 100 % Б), 8,04 мин (50 – 100 % Б); LA-Gly-Pro-5-НТ — 8,12 мин (50 – 100 % Б), 11,25 мин (30 – 100 % Б).

Все синтезированные соединения были очищены препаративной ВЭЖХ и охарактеризованы масс-спектрометрически. Концентрация препарата в пробе 10 мкг/мл, в метаноле, шприцевой ввод, тип ионизации — электроспрей.

Методика проведения экспериментов по методу РАМРА

По 1 мг LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-НТ, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-НТ растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида (DMSO) или в 4 мл ацетонитрила (ACN) и разбавляли раствор до 10 мл фосфатно-солевым буфером (PBS Am-E404-100, pH 7,4), содержащим 10 мг аскорбиновой кислоты на 100 мл буфера. Аскорбиновую кислоту добавляли для повышения устойчивости производных дофамина в растворе. В качестве мембраны использовали 0,45 мкм гидрофобную PVDF-мембрану (Millipore MAIPN4510). Мембрану обрабатывали 5 мкл 100 % додекана, 50 % додеканом в хлороформе и 25 % додеканом в хлороформе. Если исследовали влияние липидов на диффузию производных дофамина и серотонина, то мембрану обрабатывали 5 мкл 25 % додекана в хлороформе. Затем наносили 5 мкл раствора липида (10 мг/мл в смеси хлороформа с метанолом, 2:1). После удаления

растворителя мембрану вновь обрабатывали 5 мкл 25 % додекана в хлороформе. Приемник заполняли фосфатно-солевым буфером, погружали в него ячейку, заполненную 0,2 мл раствора производных дофамина и серотонина. Для контроля пригодности системы в тестовую смесь добавляли по 1 мг норфлоксацина и верапамила. В серии параллельных экспериментов обрабатывались только те экспериментальные точки, в которых их соотношение отличалось в несколько раз. Эксперименты продолжались 15 – 18 ч при температуре 20 °С. Содержание соединений в акцепторном отсеке определяли хроматомасс-спектрометрически. Наименьшее количество из производных дофамина и серотонина принимали за единицу и по нему нормализовали полученные данные по другим производным. Этот подход позволял более наглядно определить, какое из соединений лучше проникает через искусственные мембраны с учетом возможных отклонений при проведении экспериментов. Эксперименты ставились серией из 10 повторов. Из них на основе сравнения концентраций легкопроникающего и труднопроникающего стандарта выбирались 5 образцов, имеющих максимальное отношение концентраций этих стандартов. Для выбранных 5 точек рассчитывали средние значения, среднееквадратичное отклонение, доверительный интервал для доверительной вероятности 0,95.

Определение концентраций производных дофамина и серотонина

Количества ацилированных пептидных производных дофамина и серотонина, проникающих в акцепторный отсек через мембрану, определяли с использованием хроматографа Surveyor Plus с масс-спектрометрическим детектором LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США), с ионизацией электрораспылением. Пробы анализировали на колонке Reprosil pur C18aq (2 × 100 мм, размер частиц 5 мкм). Элюент А — MeOH–H₂O–AcOH–ТФУ (2,5:97,4:0,1:0,01), элюент В — MeOH, линейный градиент от 10 до 100 % В за 25 мин, скорость потока 200 мкл/мин. В качестве внутреннего стандарта использовали тетрапептид Pro-Gly-Pro-Leu. Калибровочные зависимости получали в диапазоне концентраций 0,3 – 30 мкг/мл. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование целевых соединений проводили по *m/z*, соответствующим однозарядным положительным молекулярным пикам, при ширине $\Delta m/z = 2$. Данные приведены в табл. 1.

Обычно в качестве внутренних стандартов в хроматомасс-спектрометрии используют изотопно-модифицированные соединения. Это позволяет получать линейные градуировочные зависимости в более широком диапазоне концентраций и компенсировать влияние состава элюента и примесей на эффективность ионизации анализируемых компонентов. Однако в данном случае требуемый диапазон концентраций относительно невелик (на 2 порядка) и пробы не содержат большого количества посторонних примесей. Поэтому использовался один и тот же внутренний стандарт для всех соединений. В указанном диапазоне

концентраций градуировочные зависимости компонентов были достаточно линейны и имели коэффициенты корреляции 0,989 – 0,999. Пределы обнаружения компонентов рассчитывались в соответствии с методикой [8].

Результаты и их обсуждение

Синтез LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-HT, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-HT проводили по отработанным методикам [9]. При этом необходимо отметить, что растворы соединений, в состав которых входит дофамин, неустойчивы. Поэтому при работе с ними необходимо работать с дегазированными растворителями в атмосфере аргона и добавлять к растворам аскорбиновую кислоту, т.е. учитывать специфику данного соединения.

Выбор соединений, сконструированных из пептидов и биогенных аминов, определялся тем, что при протеолизе таких соединений в клетках-мишенях происходит высвобождение биологически активного соединения. Перспективность подобного подхода показана в работе [10]. Если биологически активным соединением является дофамин или серотонин, то в результате отщепления этого фрагмента в головном мозге живого организма можно ожидать соответствующий клеточный ответ [11 – 13]. Выбор соединений, в состав которых входили жирные кислоты, определялся также расчетами, полученными с привлечением большого массива данных, имеющихся в научной литературе. Расчеты, проведенные по методу [14, 15], позволяют, исходя из строения и состава соединения, получить предварительное представление о его способности проникать в головной мозг живого организма. Значения, полученные по этой программе, представляют собой отношение содержания тестируемого соединения в головном мозге и его содержания в крови. То есть чем больше расчетная величина, тем более высокую проницаемость через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) можно ожидать.

Например, у Z-Gly-Pro-DA это отношение равно 0,059, а у LA-Gly-Pro-DA – 0,436; у Z-Gly-Pro-5-HT – 0,054, а у LA-Gly-Pro-5-HT – 0,427. Предварительный вывод, который можно сделать из этих расчетов, — присутствие остатка жирной кислоты в препарате увеличивает преодоление ГЭБ примерно в 4 – 5 раз.

Если серия синтезированных соединений рассматривается как транспортная форма дофамина или серотонина, то при использовании искусственных мембран можно определить, какое из них будет эффективнее проникать через ГЭБ.

Отработка условий проведения экспериментов, в которых можно оценить проницаемость органического соединения через мембрану, необходима для каждой группы веществ. Это во многом обусловлено тем, что эффективность проникновения через ГЭБ, по-видимому, связана с липофильностью препаратов.

Мембрану Millipore MAIPN4510 (метод РАМПА) импрегнировали разными количествами додекана. Необходимо было определить, какое количество нужно нанести на фильтр, чтобы через мембрану проникло в акцепторный отдел достаточное количество LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-HT, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-HT для получения достоверных данных. Первую серию экспериментов приводили, растворяя исходные соединения в DMSO с последующим добавлением PBS (итоговая концентрация 0,1 мг/мл). Конечный раствор содержал 5, 20 и 40 % DMSO. На мембрану наносили 5,0, 2,5, 1,25 и 0,625 мкл додекана. С уменьшением количества додекана проницаемость мембран возрастала в 4 – 4,5 раза. Лучшая проницаемость у производных серотонина и дофамина наблюдалась у соединений с лауриновым фрагментом. Но проникновение через мембрану даже этих соединений ограничивалось 0,5 – 2 %, что не позволяло использовать смесь DMSO — PBS для изучения влияния полярных липидов на проницаемость мембран.

Во второй серии экспериментов растворимость производных серотонина и дофамина увеличивали добавлением ацетонитрила (ACN). Исходный материал растворяли в 4 мл ACN с последующим добавлением 6 мл PBS (итоговая концентрация 0,1 мг/мл). Когда в акцепторный отдел вносили в качестве растворителя только PBS, количества производных дофамина и серотонина, проникающие в акцепторный отдел, достигали 1 – 2 % от количества, внесенных в донорский отдел. То есть проницаемость оказалась не выше, чем при использовании DMSO. Это связано с тем, что растворимость этих соединений в PBS мала и проникающие через мембрану производные дофамина и серотонина образовывали на ее поверхности пленку, которая затрудняла дальнейшее проникновение вещества в ак-

Таблица 1

Времена удерживания (t_r), диапазон использованных m/z и пределы обнаружения (ПО) анализируемых соединений

Соединение	М.м.	Диапазон m/z	t_r , мин	R^2	ПО, мкг/мл
LA-Gly-Pro-DA	489	489,5 – 491,5	19,09	0,994	0,62
LA-Gly-Pro-5-HT	512	412,5 – 414,5	19,11	0,997	0,42
OA-Gly-Pro-DA	571	571,5 – 573,5	21,78	0,996	0,46
OA-Gly-Pro-5-HT	594	594,5 – 596,5	21,80	0,989	0,78
Верапамил ^а	454	454,5 – 456,5	13,96	0,992	0,69
Норфлоксацин ^б	319	319,5 – 321,5	9,61	0,999	0,34
Pro-Gly-Pro-Leu ^в	382,1	382,5 – 385	4,22	-	-

Примечание: ^а легкопроницающий стандарт; ^б труднопроницающий стандарт; ^в внутренний стандарт; R^2 — коэффициент линейной корреляции.

Относительная эффективность проникновения через мембраны, импрегнированные додеканом, производных дофамина и серотонина (за единицу принималась диффузия OA-Gly-Pro-DA, проникающего в акцепторный отсек в наименьшем количестве)

Соединение	ACN*, %	Количество додекана, нанесенного на мембрану		
		5 мкл	2,5 мкл	1,25 мкл
LA-Gly-Pro-5-HT	0	1,19 ± 0,17	1,81 ± 0,22	1,67 ± 0,22
	20	3,20 ± 0,36	9,67 ± 0,95	5,29 ± 0,66
	40	16,15 ± 1,20	26,43 ± 2,2	20,95 ± 1,8
LA-Gly-Pro-DA	0	2,80 ± 0,29	3,53 ± 0,31	2,25 ± 0,25
	20	6,70 ± 0,51	10,33 ± 0,84	7,29 ± 0,58
	40	35,77 ± 3,10	55,00 ± 4,90	41,43 ± 3,8
OA-Gly-Pro-5-HT	0	1,06 ± 0,18	1,12 ± 0,16	1,17 ± 0,18
	20	1,12 ± 0,15	1,43 ± 0,18	1,24 ± 0,16
	40	1,50 ± 0,17	1,67 ± 0,15	1,57 ± 0,17

* — Количество ацетонитрила в акцепторном отсеке.

цепторный отдел. Поэтому для увеличения растворимости смеси LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-HT, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-HT акцепторный отдел также заполняли смесью PBS с ACN (табл. 2).

При добавлении 20 % ACN в акцепторный отдел проникало до 5 – 6 % наиболее проникающих через мембрану из донорского отдела производных дофамина и серотонина, содержащих жирнокислотные фрагменты. При добавлении 40 % ACN в акцепторный отдел таких производных дофамина и серотонина, содержащих жирнокислотные фрагменты, проникало до 70 %.

В результате проведенного исследования отработаны условия для оценки проникновения производных дофамина и серотонина через мембрану, обработанную додеканом. На мембрану наносили 2,5 мкл додекана и использовали в качестве растворителя в донорском и акцепторном отделе смесь 40 % ACN в PBS.

Как и в случае использования DMSO-PBS-смесей, лучшая проницаемость из производных серотонина и дофамина наблюдалась у соединений с лауриновым фрагментом, а наименьшая у OA-Gly-Pro-DA. Поэто-

му количество OA-Gly-Pro-DA в акцепторном отделе принимали за единицу, а содержание остальных производных дофамина и серотонина в акцепторном отделе нормализовали по этой величине.

В третьей серии экспериментов провели сравнение эффективности проникновения LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-HT, OA-Gly-Pro-DA, OA-Gly-Pro-5-HT через мембрану, импрегнированную смесью додекана с липидами (табл. 3).

Как и в случае использования для модификации мембраны додекана, при использовании додекана, импрегнированного липидами, установлено, что для получения меченных тритием аналогов и проведения экспериментов *in vivo* больше подходят соединения с лауриновым фрагментом. Проницаемость лауринового производного серотонина стала выше лауринового производного дофамина при добавлении липидов (табл. 3). Это, по-видимому, указывает на то, что серотониновый фрагмент легче встраивается в липидную матрицу и вероятность его диффузии через мембрану становится выше, чем у производного дофамина. При использовании фосфатидилхолина с разным жирно-

Относительная эффективность проникновения производных дофамина и серотонина через искусственные мембраны, импрегнированные липидами (за единицу принималась диффузия OA-Gly-Pro-DA, проникающего в акцепторный отсек в наименьшем количестве)

Липид	Соединение			
	LA-Gly-Pro-5-HT	LA-Gly-Pro-DA	OA-Gly-Pro-5-HT	OA-Gly-Pro-DA*
Соевый фосфатидилхолин	16,8 ± 1,3	15,7 ± 1,3	5,96 ± 0,77	1,0 (1,4 ± 0,13)
Димиристоилфосфатидилхолин	25,3 ± 1,9	20,1 ± 1,6	2,05 ± 0,18	1,0 (1,2 ± 0,15)
Дипальмитоилфосфатидилхолин	28,5 ± 2,3	28,4 ± 2,2	1,08 ± 0,14	1,0 (0,8 ± 0,11)
Фосфатидилэтаноламин	46,0 ± 4,2	42,0 ± 3,6	2,40 ± 0,21	1,0 (0,6 ± 0,09)
Фосфатидилинозит	31,7 ± 2,5	20,1 ± 1,5	2,53 ± 0,21	1,0 (0,8 ± 0,13)
1-Пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилинозитфосфат	30,1 ± 2,6	20,8 ± 1,4	1,17 ± 0,15	1,0 (0,8 ± 0,14)
Фосфатидная кислота	34,4 ± 2,8	24,4 ± 1,4	1,89 ± 0,20	1,0 (0,6 ± 0,11)
Кардиолипид	22,8 ± 2,0	20,0 ± 1,5	2,00 ± 0,22	1,0 (1,1 ± 0,15)
Фосфатидилсерин	40,0 ± 3,6	37,2 ± 3,1	2,54 ± 0,23	1,0 (0,7 ± 0,11)
Холестеринолеат	34,0 ± 2,8	21,0 ± 1,8	1,50 ± 0,14	1,0 (0,6 ± 0,10)

* — количество OA-Gly-Pro-DA (в процентах), обнаруженные в акцепторном отделе, относительно добавленного в донорский отдел.

кислотным составом установлено, что эти изменения заметно влияют на проницаемость мембраны. Так, проницаемость ОА-Gly-Pro-5-НТ при использовании соевого фосфатидилхолина возрастает в несколько раз, по сравнению с использованием дипальмитоил-фосфатидилхолина.

Наименьшая проницаемость, как и в случае с использованием чистого додекана, наблюдается у ОА-Gly-Pro-DA. Только от 0,5 до 2 % этого пептида обнаружено в акцепторном отделе относительно его количества, добавленного в донорский отдел в случае, когда на мембраны наносили додекан. Если мембраны импрегнированы додеканом и липидами, то проницаемость ОА-Gly-Pro-DA варьировалась от 0,6 до 1,4 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Ю. Бобров, А. А. Лыжин, Е. Л. Андрианова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **142**(10), 406 – 408 (2006).
2. М. Г. Акимов, Н. М. Грецькая, К. В. Шевченко и др., *Биоорг. химия*, **33**(6), 648 – 652 (2007).
3. T. Bisogno, D. Melck, M. Y. Bobrov, et al., *Biochem. J.*, **351**(3), 817 – 824 (2000).
4. М. Ю. Бобров, Е. Е. Генрихс, И. В. Барсков, *Тез. докл. Междунар. конф. "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация"*, под ред. В. П. Зинченко, С. С. Колесникова, А. В. Брежнева, Пушкино, Московская область (2011), сс. 94 – 98.
5. G. Lee, S. Dallas, M. Hong, R. Bendayan, *Pharmacol. Rev.*, **53**(4), 569 – 596 (2001).
6. L. Di, E. H. Kerns, K. Fan, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **38**(3), 223 – 232 (2003); doi: 10.1016/S0223-5234(03)00012-6.
7. V. P. Shevchenko, M. L. Tsirenina, J. G. Molotkovsky, L. D. Bergelson, *Chem. Phys. Lipids*, **15**(2), 95 – 104 (1975); doi: 8.10.1016/0009-3084(75)90034-1
8. *Валидация аналитических методик ОФС. 1.1.0012.15*, Государственная фармакопея РФ, XIV изд., Часть 1, Москва (2018).
9. А. А. Гершкович, В. К. Кибирев, *Химический синтез пептидов*, Наукова думка, Киев (1992).
10. S. Huang, R. Fang, J. Xu, et al., *J. Drug Target.*, **19**(7), 487 – 496 (2011); doi: 10.3109/1061186X.2010.511225.
11. C. J. Chu, S. M. Huang, L. De Petrocellis, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**(16), 13633 – 13639 (2003); doi: 10.1074/jbc.M211231200.
12. S. Yehuda, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **72**(1–2), 7 – 11 (2002); doi: 10.1016/S0091-3057(01)00646-3.
13. V. E. Shashoua, G. W. Hesse, *Life Sci.*, **58**(16), 1347 – 1357 (1996); doi: 10.1016/0024-3205(96)00101-4.
14. Е. В. Радченко, П. В. Карпов, С. Б. Соснин и др., *Тез. докл. XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*, Екатеринбург (2016), с. 432.
15. А. С. Дябина, Е. В. Радченко, В. А. Палюлин, Н. С. Зефиоров, *Докл. Академии Наук*, **470**(6), 720 – 723 (2016); doi: 10.7868/S0869565216300253.

Поступила 24.02.20

INVESTIGATION OF THE MEMBRANOTROPIC PROPERTIES OF ACYLATED PEPTIDE DERIVATIVES OF DOPAMINE AND SEROTONIN USING THE PAMPA METHOD

V. P. Shevchenko¹, L. A. Andreeva¹, K. V. Shevchenko^{1*}, I. Yu. Nagaev¹, and N. F. Myasoedov¹

¹ Institute of Molecular Genetics, National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

* e-mail: ATCarma@mail.ru

Peptide derivatives of dopamine (DA) and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) acylated with lauric acid (LA) and oleic acid (OA) have been synthesized, including LA-Gly-Pro-DA, LA-Gly-Pro-5-HT, OA-Gly-Pro-DA, and OA-Gly-Pro-5-HT. A mass spectrometric method has been developed for assessing the content of dopamine and serotonin derivatives in phosphate-buffered saline (PBS Am-E404-100, pH 7.4) medium. It is shown that these compounds can penetrate through artificial membranes. A special mixture of these compounds was used for modeling a situation whereby the diffusion of molecules of dopamine and serotonin derivatives through the membrane occurred as a result of their competitive interaction, which allowed us to reliably determine which compounds in this mixture more easily penetrated through artificial membranes. Evaluation of the comparative permeability of blood-brain barrier (BBB) was carried out by the method of parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). It was established that, in terms of overcoming the BBB, the most promising diffusers were LA-Gly-Pro-5-HT for serotonin derivatives and LA-Gly-Pro-DA for dopamine derivatives.

Keywords: peptide acyl derivatives; dopamine; serotonin; PAMPA; artificial membranes.