

УДК 546.100.02.3:547/17

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА ЧЕРЕЗ ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ

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

Поступило 11.06.2019 г.

Разработан масс-спектрометрический метод определения содержания производных дофамина и серотонина в зависимости от строения их пептидного фрагмента, позволяющий оценить эффективность их проникновения через искусственные мембраны, при использовании их раствора в PBS. В этом случае диффузия молекул производных дофамина и серотонина через мембрану происходила в результате конкурентных взаимодействий. Показано, какие соединения в этой смеси легче проникали через искусственные мембраны. Установлено, что наиболее перспективными в плане преодоления гематоэнцефалического барьера из производных серотонина являются Вос-Pro-Srt, из производных дофамина Вос-Pro-DOPA.

**Ключевые слова:** искусственные мембраны, пептидные производные, дофамин, серотонин, диффузия.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524886682-684>

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) поддерживает гомеостаз мозга и обеспечивает клетки мозга уникальной внеклеточной средой, оптимальной для гуморальной передачи. Морфологический субстрат ГЭБ представляет собой слой эндотелиальных клеток микрососудов мозга. Проницаемость пептидов через ГЭБ в направлении от крови к мозгу или от мозга к крови определяется в первую очередь их липофильностью [1]. Чтобы оценить влияние пептидсодержащих производных биологически активных соединений на центральную нервную систему, необходимо выяснить, какие из них лучше проникают через ГЭБ.

Известно, что многие пептиды и пептидсодержащие производные биологически активных соединений способны проникать через ГЭБ, используя лишь пассивную диффузию [2]. Поэтому на первых этапах поиска кандидатов в лекарственные препараты при проведении скрининга большого количества веществ можно значительно ускорить работу, используя модель без активного транспорта. Такой моделью является метод РАМРА (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) и использование ячейки Франца. Эти методы основаны на применении искусственно сконструированных клеточных мембран на основе додекана и смеси додекана с полярными липидами [3]. В результате возникает возможность определить, какие из синтезированных

соединений имеют больший шанс преодолеть ГЭБ, и, следовательно, их можно использовать для дальнейших исследований.

Цель данной работы — оценка способности преодоления искусственных мембран пептидными производными дофамина и серотонина.

Разработана методика хромато-масс-спектрометрического анализа содержания Z-Gly-Pro-DOPA, Z-Gly-Pro-Srt, Вос-Gly-Pro-DOPA, Вос-Gly-Pro-Srt, Вос-Pro-DOPA, Вос-Pro-Srt. Количество пептидсодержащих производных дофамина и серотонина, проникающих в акцепторный отсек, 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, 5 мкм, 2 · 100 мм. Элюент А — MeOH–вода–AcOH–TФУ (2,5:100:0,1:0.01), 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. Детектирование целевых соединений проводили по  $m/z$ , соответствующим однозарядным положительным молекулярным пикам, при ширине  $\Delta m/z = 2$ . В указанном диапазоне концентраций линейные градуировочные зависимости компонентов имели коэффициенты корреляции 0,997–0,999. Данные приведены в табл. 1.

Тестирование проводили с использованием ячейки Франца и метода РАМРА. По 1 мг Z-Gly-

Институт молекулярной генетики Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: [nagaev@img.ras.ru](mailto:nagaev@img.ras.ru)

**Таблица 1.** Время удерживания и диапазон значений  $m/z$  соединений, анализируемых хромато-масс-спектрометрией

| Соединение       | Молекулярная масса | Диапазон $m/z$ | tr, мин |
|------------------|--------------------|----------------|---------|
| Z-Gly-Pro-DOPA   | 441                | 441,5–443,5    | 13,5    |
| Z-Gly-Pro-Srt    | 464                | 464,5–466,5    | 13,9    |
| Boc-Gly-Pro-DOPA | 407                | 407,5–409,5    | 12,7    |
| Boc-Gly-Pro-Srt  | 430                | 430,5–432,5    | 13,2    |
| Boc-Pro-DOPA     | 350                | 350,5–352,5    | 12,8    |
| Boc-Pro-Srt      | 373                | 373,5–375,5    | 13,4    |
| Верапамил        | 454                | 454,5–456,5    | 14,1    |
| Норфлуксацин     | 319                | 319,5–321,5    | 9,74    |
| Pro-Gly-Pro-Leu  | 382,1              | 382,5–385      | 5,06    |

Pro-DOPA, Z-Gly-Pro-Srt, Boc-Gly-Pro-DOPA, Boc-Gly-Pro-Srt, Boc-Pro-DOPA, Boc-Pro-Srt растворяли 0,4 мл диметилсульфоксида 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. Для контроля пригодности системы в тестовую смесь добавляли по 1 мг норфлуксацина (трудно проникающий стандарт) и верапамила (хорошо проникающий стандарт). Если концентрации этих соединений в акцепторном отсеке различались примерно на порядок, то результаты считались достоверными. В донорский отсек помещали 0,2 мл тестового раствора. Акцепторный отсек заполняли фосфатно-солевым буфером.

В качестве мембраны между донорским и акцепторным отсеками для ячейки Франца использовали фильтр 1 (Fluoropore PTFE 0,45 мкм, “Millipore-Merck”) и фильтр 2 (Durapore PVDF 0,45 мкм, гидрофобный, “Millipore-Merck”). При использовании метода PAMPA в качестве мембраны использовали 0,45 мкм гидрофобную мембрану PVDF (“Millipore MAIPN4510”). Мембраны пропитывали додеканом (табл. 2). Процесс вели от 15–19 ч до 3 сут.

Поскольку ставилась задача не определить абсолютную проникающую способность производных дофамина и серотонина, а сравнить, какое из этих соединений более эффективно преодолевает искусственные мембраны, полученные значения нормализовали, принимая за единицу количество вещества, которое в наименьшей степени проникало в акцепторный отсек.

Данный подход позволил сравнить эффективность проникновения через мембраны производных дофамина и серотонина с учётом возможных отклонений при проведении экспериментов. В результате

**Таблица 2.** Эффективность проникновения производных дофамина и серотонина через мембраны, импрегнированные додеканом (за единицу принималась диффузия соединения, имеющая наименьшее значение)

| Соединение       | Продолжительность эксперимента |        |         |          |          |
|------------------|--------------------------------|--------|---------|----------|----------|
|                  | 18 ч                           | 18 ч   | 18 ч    | 18 ч     | 72 ч     |
| Boc-Pro-Srt      | 2,58*                          | 2,28** | 3,09*** | 5,47**** | 8,48**** |
| Boc-Gly-Pro-Srt  | 2,18                           | 1,60   | 1,96    | 4,37     | 6,99     |
| Z-Gly-Pro-Srt    | 1,48                           | 1,34   | 1,72    | 3,98     | 5,98     |
| Boc-Pro-DOPA     | 1,49                           | 1,18   | 1,18    | 1,35     | 2,00     |
| Boc-Gly-Pro-DOPA | 1,31                           | 1,13   | 1,18    | 1,31     | 2,08     |
| Z-Gly-Pro-DOPA   | 1,0                            | 1,0    | 1,0     | 1,0      | 1,0      |

\* фильтр (PAMPA), импрегнирован 2,5 мкл додекана;

\*\* фильтр (PAMPA), \*\*\* фильтр 2; \*\*\*\*фильтр 1, импрегнированы 5 мкл додекана.

разброс данных при проведении повторных экспериментов был не более 5%.

При принудительной циркуляции PBS (перемешивание на магнитной мешалке) в акцепторном отсеке диффузия соединений увеличивалась примерно в 2 раза. При увеличении времени эксперимента в 3 раза в акцепторном отсеке обнаруживалось примерно в 1,5 раза больше производных дофамина и серотонина. Но в любом случае последовательность в ряду производных дофамина и серотонина по способности диффундировать через мембрану не менялась. Лучшие значения проницаемости оказались у Boc-Pro-Srt и Boc-Pro-DOPA.

Интересно сравнить данные, полученные при тестировании проникновения через искусственные мембраны производных дофамина и серотонина с использованием ячейки Франца и метода PAMPA, с расчётными данными, полученными по методу [4, 5]. По этому методу рассматривали влияние строения вещества на преодоление ГЭБ с привлечением большого массива данных, имеющихся в научной литературе. Из данных, полученных по методу [4, 5], следовало, что Boc-Pro-Srt будет легче преодолевать ГЭБ, чем другие производные серотонина, а Boc-Pro-DOPA – в 1,5 раза легче, чем Boc-Gly-Pro-DOPA. Следовательно, в случае производных серотонина и дофамина расчётные данные и данные, полученные при использовании ячейки Франца и метода PAMPA, не противоречат друг другу.

Сравнение эффективности проникновения пептидных производных дофамина и серотонина через искусственные мембраны, импрегнированные смесью липидов и додекана, даны в табл. 3. В качестве липидов использовали кардиолипин, лецитин, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин (10 мг/мл) – препараты фирмы “Сигма” (США). Эксперименты проводили по методу PAMPA. На мембрану

**Таблица 3.** Сравнение эффективности проникновения производных дофамина и серотонина через искусственные мембраны, импрегнированные липидами (за единицу принималась диффузия соединения, имеющая наименьшее значение)

| Соединение       | Условия эксперимента |         |                  |                       |
|------------------|----------------------|---------|------------------|-----------------------|
|                  | Кардиолипид          | Лецитин | Фосфатидил-серин | Фосфатидил-этаноламин |
| Boc-Pro-Srt      | 5,33                 | 10,61   | 5,10             | 2,91                  |
| Boc-Gly-Pro-Srt  | 4,27                 | 2,99    | 1,95             | 2,06                  |
| Z-Gly-Pro-Srt    | 2,59                 | 2,31    | 2,10             | 2,20                  |
| Boc-Pro-DOPA     | 1,57                 | 2,72    | 2,44             | 1,79                  |
| Boc-Gly-Pro-DOPA | 1,28                 | 1,25    | 1,32             | 1,32                  |
| Z-Gly-Pro-DOPA   | 1,0                  | 1,0     | 1,0              | 1,0                   |

наносили 5 мкл 25%-го додекана в хлороформе. После удаления растворителя наносили на мембрану 5 мкл раствора липида. После удаления растворителя наносили еще 5 мкл 25%-го додекана в хлороформе.

Так же как и при использовании мембран, импрегнированных только додеканом, наименьшая проникающая способность оказалась у Z-Gly-Pro-DOPA. Поэтому во всех повторных экспериментах количество Z-Gly-Pro-DOPA в акцепторном отсеке принималось за единицу, а другие соединения нормализовали по количеству Z-Gly-Pro-DOPA в акцепторном отсеке в каждом из этих повторных экспериментов.

Как видно из табл. 3, закономерности, выявленные при использовании мембран, обработанных только додеканом, сохранились. Из трёх производных серотонина и дофамина легче через искусственные мембраны проникают Boc-Pro-Srt и Boc-Pro-DOPA.

Мембраны, импрегнированные лецитином, способствуют в большей степени увеличению проникновения для Boc-Pro-Srt (из производных серотонина) и для Boc-Pro-DOPA (из производных дофамина). Относительно большему увеличению проникновения Boc-Gly-Pro-Srt через мембрану способствовал кардиолипид. Влияние других липидов на диффузию этих соединений отличается мало, но

в целом обработка PVDF мембраны ("Millipore MAIPN4510") липидами повышала её проницаемость для производных серотонина и дофамина относительно использования одного додекана.

**Источники финансирования.** Работу проводили при частичной поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН "Инновационные разработки в биомедицине" и "Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maryanovich A.T., Kormilets D. Yu., Polyansky A.D. // J. Psychology and Brain Studies. 2017. V. 1. № 1. P. 1–5.
2. Lee G., Dallas S., Hong M., et al. // Pharmacol. Rev. 2001. V. 53. № 4. P. 569–596.
3. Di L., Kerns E.H., Fan K., et al. // Eur. J. Med. Chem. 2003. V. 38. № 3. P. 223–232.
4. Радченко Е.В., Карпов П.В., Соснин С.Б. и др. "Система прогнозирования фармакокинетических свойств и токсичности лекарственных веществ" // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Екатеринбург. 26–30 сентября 2016 г. С. 432.
5. Дябина А.С., Радченко Е.В., Палюлин В.А., и др. // ДАН 2016. Т. 470. № 6. С. 720–723.

## EFFICIENCY OF PENETRATION OF DOPAMINE AND SEROTONIN PEPTIDE DERIVATIVES THROUGH THE ARTIFICIAL MEMBRANES

V. P. Shevchenko, L. A. Andreeva, I. Yu. Nagaev,  
K. V. Shevchenko, Academician of the RAS N. F. Myasoedov

*Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received June 11, 2019

A mass spectrometric method has been developed for determining the content of dopamine and serotonin derivatives, which allows to evaluate the efficiency of their penetration through artificial membranes depending on the structure of their peptide fragment. In this case, the diffusion of dopamine and serotonin derivatives through the membrane occurred as a result of competitive interactions. It was shown which compounds in this mixture more easily penetrate through artificial membranes. It was found that the most promising in terms of overcoming the BBB are Boc-Pro-Srt and Boc-Pro-DOPA.

**Keywords:** artificial membranes, peptide derivatives, dopamine, serotonin, diffusion.