

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧЕРНІЙ Світлана Вікторівна

УДК 577.336+547.458.83+577.112.7

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФТАЛОЦІАНІНОВИХ КОМПЛЕКСІВ З АКсіАЛЬНО-
КООРДИНОВАНИМИ ЗАМІСНИКАМИ ЯК ІНГІБІТОРІВ АМІЛОЇДНОЇ
АГРЕГАЦІЇ БІЛКІВ**

03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник

Ковальська Владислава Борисівна

доктор біологічних наук

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Черній С.В. Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

У патогенез багатьох конформаційних захворювань, включаючи нейродегенеративні розлади та амілоїдоза, залучені білки, що утворюють β -складчасті стабільні агрегати – амілоїдні фібрили. Одним з важливих підходів проти амілоїдної агрегації білків є пошук молекул, здатних інгібувати або перенаправляти утворення амілоїдних фібрил. Метою даної роботи є пошук потенційних інгібіторів амілоїдної агрегації серед макроциклічних комплексів (фталоціанінів, порфіразинів) різної геометрії та дослідження того, як їх взаємодія з білками впливає на агрегацію білків та морфологію продуктів агрегації.

Для дослідження кінетики агрегації білків використовували флуоресцентну спектроскопію на основі амілоїдчутливого барвника, для характеристики морфології окремих агрегатів використовували атомно-силову та скануючу електронну мікроскопію; метод динамічного розсіяння світла використовували для оцінки гідродинамічних параметрів агрегатів. Також для вивчення самоасоціації фталоціанінів та їх взаємодії були використані спектроскопія електронного поглинання та раманівська спектроскопія.

Фталоціанінові комплекси гафнію та цирконію з аксіально координованими лігандами змінюють кінетику реакції фібрилоутворення інсуліну та структуру агрегатів. Показано, що інтенсивність фібрилоутворення може бути значно пригнічена досліджуваними фталоціанінами (до 96%). Фталоціаніни гафнію та цирконію з хіноліновим стириловим лігандом

виявляють однакову високу інгібуючу активність близько 90% і схожі значення IC_{50} , що дорівнюють $0,16 \pm 0,08 \mu M$ для PcHfQStr і $0,11 \pm 0,04 \mu M$ для PcZrQStr. Подібні значення інгібуючої активності і IC_{50} свідчать про те, що природа «закритого» центрального атома металу не впливає на інгібуючу активність.

Залежно від структури аксіально координованих лігандів, взаємодія фталоціанінів з інсуліном протягом агрегації може перенаправляти фібрилоутворення в бік формування продуктів різної морфології: одиночних протофіламентів, олігомерних або великих аморфних агрегатів. Вільний інсулін утворює ниткоподібні агрегати - амілоїдні фібрили діаметром близько 6-8 нм і довжиною близько 1-5 μm з розгалуженою морфологією. Присутність фталоціаніну гафнію (PcHfCl₂) із замісником малого розміру індукує появу великих агрегатів діаметром близько 70-100 нм, що можуть бути ідентифіковані як аморфні. Присутність фталоціаніну цирконію (PcZrDbm₂) з об'ємними лігандами перенаправляє реакцію фібрилоутворення інсуліну в бік формування в основному олігомерних агрегатів діаметром до 10 нм. У присутності фталоціаніну гафнію (PcHfQStr), що містить хіноліновий стириловий фрагмент, кількість і діаметр утворених фібрил значно зменшуються, спостерігаються лише одиночні нитки діаметром близько 1-2 нм і фібрили діаметром близько 6 нм.

Досліджено також вплив фталоціаніну PcHfQStr на амілоїдну агрегацію лізоциму. Присутність фталоціаніну призводило до утворення довгих філаментів до 2,5 μm з діаметром 1,5-3,5 нм. Сформовані у присутності PcHfQStr фібрили помітно відрізнялися від фібрил вільного лізоциму – коротких лінійних агрегатів з діаметрами 3-5 нм і довжиною до 0,6 μm . Формування тонших і довших фібрил лізоциму у присутності фталоціаніну можна пояснити можливим зв'язуванням фталоціаніну із борозенками у структурі амілоїдної фібрили, що ускладнює скручування протофіламентів, але не перешкоджає їх подовженню.

Показано також інгібуючу активність фталоціанінів і порфіразинів цинку та магнію планарної структури на кінетику фібрилоутворення інсуліну.

Взаємодія Mg-вмісних комплексів з інсуліном сильніше пригнічує агрегацію білка порівняно з їх аналогами, що містять Zn. Взаємодія порфіразинів цинку та магнію з інсуліном протягом фібрилоутворення призводить до утворення коротших фібрил порівняно з вільним білком. Гідродинамічні параметри популяції фібрил, оцінені за допомогою динамічного розсіяння світла, в цілому корелюють з розміром одиничних фібрил, отриманих скануючою електронною мікроскопією.

Методом спектроскопії електронного поглинання було показано, що аксіально-координовані фталоціаніни з більш високою схильністю до самоасоціації виявляють більш високу інгібуючу активність у реакції фібрилоутворення у порівнянні з комплексами, що мають низьку схильність до самоасоціації. У той же час самоасоціати не беруть безпосередньої участі в механізмі інгібування фібрилоутворення інсуліну, тому що фталоціаніни зв'язуються з білком в мономерній формі. Показано руйнування самоасоціатів фталоціаніну в присутності інсулінових амілоїдних фібрил методом спектроскопії електронного поглинання, що свідчить про утворення комплексу між ними. Можна припустити, що схильність фталоціанінів до самоасоціації є «індикатором» їх взаємодії з ароматичними амінокислотами білка та їх антифібриллогенних властивостей.

Досліджено можливість використання поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії на наночастинках срібла для характеристики взаємодії між молекулою фталоціаніну та амілоїдними фібрилами. Також було показано утворення комплексу між амілоїдними фібрилами і фталоціаніном. Найбільший приріст інтенсивності піків фталоціаніну в раманівському спектрі в присутності фібрил інсуліну становить 10 разів для молярного співвідношення фібрили: фталоціанін 1:3,5.

Згідно літературних даних, структурною основою впливу макроциклічних сполук на утворення амілоїдних фібрил є специфічні π - π взаємодії між ароматичною макроциклічною системою сполук і ароматичними залишками амінокислот у складі білка. Таким чином, ліганди аксіально координованих

фталоціанінів, залежно від структури та геометрії, можуть або забезпечити додаткову фіксацію при зв'язуванні з білком або перешкоджати цьому зв'язуванню. У випадку фталоціанінів і порфіразинів планарної будови з «відкритим» центральним атомом металу, атом металу може сприяти взаємодії макроциклічної сполуки з білком за рахунок додаткової координації. Різниця між Zn- і Mg-вмісними комплексами можна пояснити здатністю атома цинку координувати гістидинові залишки білка. Таким чином, фталоціаніни та порфіразини магнію та цинку можуть мати різні сайти зв'язування з молекулою інсуліну і по-різному впливати на фібрилоутворення.

Ключові слова: амілоїдні фібрили, фібрилоутворення, фталоціаніни, порфіразини, інгібітор, флуоресцентна спектроскопія, мікроскопія, спектроскопія електронного поглинання

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, **S. Chernii**, M. Losytskyu, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2018. – Vol. 31(1). – e2660. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціанінів та порфіразинів магнію та цинку на фібрилоутворення, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

2. Characterization of the interaction between phthalocyanine and amyloid fibrils by surface-enhanced raman scattering (SERS) / M. Losytskyu, N. Akbay, **S. Chernii**,

E. Avci, V. Chernii, S. Yarmoluk, M. Culha, V. Kovalska // Analytical Letters. – 2018. – Vol. 51(1-2). – P. 221-228. *Особистий внесок здобувача – отримання зразків фібрил, обробка результатів.*

3. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme / V. Kovalska, **S. Chernii**, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, O. Varzatskii, A. Naumovets, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2017. – Vol. 30(8). – e2622. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціаніну з аксіально-координованим замісником на фібрилоутворення спектральними методами, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

4. Design of 4-(4-dialkylaminostyryl)-pyridinium dyes for fluorescent detection of amyloid fibrils / D. Inshyn, **S. Chernii**, V. Kovalska, S. Yarmoluk // Biopolymers and Cell. – 2017. – Vol. 32(4). – P. 289-299. *Особистий внесок здобувача – дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей серії стрілпіридинових барвників як зондів для детекції амілоїдних фібрил, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

5. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: effect of the out-of-plane ligands / V. Kovalska, V. Cherepanov, **S. Chernii**, M. Losytskyu, A. Senenko, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol.22(24). – P. 6918-6923. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення інсуліну, обробка результатів, участь у написанні статті.*

6. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness / V. Kovalska, M. Losytskyu, **S. Chernii**, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(6). – P. 473-479. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення, дослідження їх агрегаційних властивостей, підготовка статті до друку.*

7. Study of inhibitory activity of phthalocyanine-related complexes against pathological amyloid aggregation / S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii S. Yarmoluk, V. Kovalska // Abstract of FEBS Advanced course 2018 «Hydrodynamic and thermodynamic analysis of biological macromolecules and their interactions» September 23-28, Prague, Czech Republic, P. 24.

8. β -ketoenole dye as an amyloid-sensitive fluorescent probe for bacterial biofilm investigation / S. Chernii, O. Moshynets, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine, P.

9. Spectral-luminescent characterization of β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyu, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk, V. Kovalska // "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2017) Chernivtsi, Ukraine. P. 158.

10. β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyu, A. Gorski, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXIII ISSSMC) 2017 Kyiv, Ukraine. P.221

11. Use of SERS for characterization of interaction between phthalocyaninecomplex and amyloid fibrils / M. Losytskyu, N. Akbay, S. Chernii, E. Avci, V. Chernii, M. Culha, V. Kovalska // International conference 10th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2016), Çanakkale, Turkey. P. 324.

12. The effect of Zn and Mg phthalocyanines on insulin amyloid aggregation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, J. Ostapko, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2016» (ХКЧ'16) Харків, Україна. P.13-14.

13. Effect of the macrocyclic metal complexes on lysozyme amyloid aggregation S.V. Chernii, V. Kovalska, V. Cherepanov, M. Losytskyu, I. Tretyakova, O. Varzatskyu, S. Yarmoluk // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects October 1-4 2015, Kyiv, Ukraine. P.43.

14. Effect of the out-of-plane ligands on the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanine complexes / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // XIX конференція з неорганічної хімії за участю закордонних учених, 7-11.09.2014, Одеса, Україна, С.26.

15. Amino-substituted β -ketoenole dyes for fluorescent detection of amyloid fibril / S. Chernii, N. Akbay, V. Chernii, I. Tretyakova, Ya. Dovbiy, V. Kovalska // The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF), September 13-16 2015 Würzburg, Germany, P.99.

16. Anti-fibrillogenic activity of the phthalocyanine complexes: Role of the out-of plane ligands / V. Kovalska, S. Chernii, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2014), 23-30.08.2014, Lviv, Ukraine P.91-92.

17. Phthalocyanines with out-of-plane quinolinium styryl ligand as inhibitors of insulin amyloid fibrils formation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Cherepanov, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», 29-30.05.2014, Київ, Україна. - P. 25.

18. Phthalocyanines with axially-coordinated styryl-quinolinium ligand as anti-fibrillogenic agents / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. - P. 157.

19. Correlation of anti-fibrillogenic activity of hafnium phthalocyanines and their tendency to self-association / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii,

S. Yarmoluk // 14th International conference-school «Advanced materials and technologies» 27-31.08.2012, Palanga Lithuania. - P. 124.

SUMMARY

Chernii S.V. Investigation of phthalocyanine complexes with axially-coordinated ligands as inhibitors of amyloid aggregation of proteins. – Manuscript.

Thesis for scientific degree of Candidate of Sciences in Biology (Doctor of Philosophy), speciality 03.00.03 – Molecular biology. Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the pathogenesis of many conformational diseases, including neurodegeneration and amyloidoses, involved proteins forming β -pleated stable aggregates called amyloid fibrils. One of the important approaches against amyloid aggregation is a search for molecules able to inhibit or redirect the formation of amyloid fibrils. The goal of this work is to find potential inhibitors of amyloid aggregation among macrocyclic metal complexes (phthalocyanines, porphyrins) of different geometry and investigate how their interaction with proteins affects protein aggregation and morphology of the aggregation products.

A fluorescent dye based assay was used to study the kinetics of protein aggregation, atomic force and scanning electron microscopies (SEM) – to characterize the morphology of single aggregates, dynamic light scattering (DLS) – to estimate the hydrodynamic parameters of the aggregates. Also, UV-VIS absorption and Raman spectroscopy were used to study the phthalocyanine aggregation and binding ability of phthalocyanines.

Hf and Zr phthalocyanine complexes with axially coordinated ligands were strongly able to change the kinetics of the aggregation reaction and structure of the aggregates. It was shown that the intensity of the kinetic of amyloid fibril formation could be significantly suppressed by axially coordinated phthalocyanines (up to 96%). Zr and Hf phthalocyanines with quinolinium styryl ligand demonstrated the same high inhibitory activity of about 90% and similar values of IC_{50} equal to $0.16 \pm 0.08 \mu\text{M}$ for PcHfQStr and $0.11 \pm 0.04 \mu\text{M}$ for PcZrQStr. Similar values of inhibitory activity and

IC₅₀ suggest that the nature of the «closed» central metal atom does not affect the inhibitory activity.

Depending on the structure of axially coordinated ligands, binding of phthalocyanines to insulin during its aggregation reaction could redirect fibrillization towards the formation of products of different morphology: single β -pleated protofilaments, oligomeric aggregates or large amorphous species. Insulin itself forms elongated filamentous species – amyloid fibrils with diameter about 6-8 nm and length about 1-5 μm with branched morphology. The presence of Hf phthalocyanine (PcHfCl₂) with small-size ligands induces the appearance of large size aggregates with diameter about 70-100 nm, that are identified as amorphous species. The presence of Zr phthalocyanine (PcZrDbm₂) with bulky ligands redirects insulin fibril reaction to the formation of oligomeric aggregates with the diameter up to 10 nm as main product. In the presence of Hf phthalocyanine (PcHfQStr) containing the quinolinium styryl fragment, the number and diameter of formed fibrils is significantly reduced, only single filaments with diameter about 1-2 nm and fibrils with diameter about 6 nm were observed.

It was also studied the effect of PcHfQStr on lysozyme amyloid aggregation. The presence of the phthalocyanine led to the formation of long filaments up to 2.5 μm with the diameter of 1.5-3.5 nm. These fibrils noticeably differed from those of free lysozyme short linear species with the diameters of 3-5 nm and the length up to 0.6 μm . Due to thinning and elongation of fibrils we could suggest that the PcHfQStr bind mainly to the grooves of protofilaments; this hinders the stacking of early aggregates or protofilaments together but does not hinder their growth.

The inhibitory activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines of planar structure on the kinetics of insulin fibrillization was also shown. Interaction of Mg-containing complexes with insulin more strongly suppresses the protein aggregation comparing to their Zn-containing analogs. Binding of Zn and Mg porphyrazines to insulin during fibrillization led to the formation of shorter fibrils comparing to free protein. Hydrodynamic diameters of fibrils population estimated by DLS generally correlate with the size of single fibrils obtained by SEM.

Absorption spectroscopy study revealed that axially coordinated phthalocyanines with a higher tendency to self-association demonstrate higher inhibitory activity in fibrillization reaction compared to poorly associated complexes. At the same time low-order self-associates are not involved directly in the mechanism of inhibition of insulin fibrillization and the phthalocyanines bind with protein in monomeric form. It was shown the destruction of phthalocyanine self-associates in the presence of insulin amyloid fibrils by UV-VIS absorption spectroscopy, which is evidence of complex formation between them. Tendency of phthalocyanines to self-association in aqueous media seems to be an «indicator» of their proneness to stack with protein aromatic amino acids and thus of their antifibrillogenic properties.

The applicability of surface enhanced Raman scattering on silver nanoparticles for characterization of interaction between the phthalocyanine molecule and amyloid fibril was studied. The formation of complex between amyloid fibrils and phthalocyanine was also demonstrated. The biggest increase in the intensity of the phthalocyanine peaks in the Raman spectrum in the presence of insulin fibrils was 10 times for the fibrils:phthalocyanine molar ratio 1:3.5.

According to literature, the structural basis for the effect of macrocyclic compound on amyloid fibril formation relies on specific π - π interactions between the aromatic ring system of molecules and aromatic residues of proteins. We have suggested that ligands of axially coordinated phthalocyanines, dependently on structure and geometry, could provide additional fixation upon the binding to the protein or prevent this binding. In the case of phthalocyanines and porphyrazines with «opened» central metal atom, it can contribute to the interaction of the macrocyclic compound to protein due to additional coordination bonding. The difference between Zn- and Mg-containing complexes could be explained by ability of Zn atom of phthalocyanine to coordinate to the histidine residues of protein. This way Mg and Zn phthalocyanines could have different preferable sites for the binding to insulin molecule and differently affect fibril formation.

Keywords: fibrillization, amyloid fibrils, phthalocyanines, porphyrazines, inhibitor, fluorescent spectroscopy, microscopy, UV-VIS absorption spectroscopy

LIST OF PUBLICATIONS OF THESIS FOR GETTING A PHD DEGREE

Articles

1. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, **S. Chernii**, M. Losytsky, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // *Journal of Molecular Recognition*. – 2018. – Vol. 31(1). – e2660.
2. Characterization of the interaction between phthalocyanine and amyloid fibrils by surface-enhanced raman scattering (SERS) / M. Losytsky, N. Akbay, **S. Chernii**, E. Avcı, V. Chernii, S. Yarmoluk, M. Culha, V. Kovalska // *Analytical Letters*. – 2018. – Vol. 51(1-2). – P. 221-228.
3. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme / V. Kovalska, **S. Chernii**, V. Cherepanov, M. Losytsky, V. Chernii, O. Varzatskii, A. Naumovets, S. Yarmoluk // *Journal of Molecular Recognition*. – 2017. – Vol. 30(8). – e2622.
4. Design of 4-(4-dialkylaminostyryl)-pyridinium dyes for fluorescent detection of amyloid fibrils / D. Inshyn, **S. Chernii**, V. Kovalska, S. Yarmoluk // *Biopolymers and Cell*. – 2017. – Vol. 32(4). – P. 289-299.
5. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: effect of the out-of-plane ligands / V. Kovalska, V. Cherepanov, **S. Chernii**, M. Losytsky, A. Senenko, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol.22(24). – P. 6918-6923.
6. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness / V. Kovalska, M. Losytsky,

S. Chernii, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29(6). – P. 473-479.

Conference abstracts

7. Study of inhibitory activity of phthalocyanine-related complexes against pathological amyloid aggregation / S. Chernii, M. Losytskyy, V. Chernii S. Yarmoluk, V. Kovalska // Abstract of FEBS Advanced course 2018 «Hydrodynamic and thermodynamic analysis of biological macromolecules and their interactions» September 23-28, Prague, Czech Republic, P. 24.

8. β -ketoenole dye as an amyloid-sensitive fluorescent probe for bacterial biofilm investigation / S. Chernii, O. Moshynets, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine, P.

9. Spectral-luminescent characterization of β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyy, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk, V. Kovalska // "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2017) Chernivtsi, Ukraine. P. 158.

10. β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyy, A. Gorski, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXIII ISSSMC) 2017 Kyiv, Ukraine. P.221

11. Use of SERS for characterization of interaction between phthalocyaninecomplex and amyloid fibrils / M. Losytskyy, N. Akbay, S. Chernii, E. Avci, V. Chernii, M. Culha, V. Kovalska // International conference 10th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2016), Çanakkale, Turkey. P. 324.

12. The effect of Zn and Mg phthalocyanines on insulin amyloid aggregation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyy, J. Ostapko, A. Gorski, V. Chernii, S.

Yarmoluk // VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2016» (ХКЧ'16) Харків, Україна. P.13-14.

13. Effect of the macrocyclic metal complexes on lysozyme amyloid aggregation S.V. Chernii, V. Kovalska, V. Cherepanov, M. Losytskyu, I. Tretyakova, O. Varzatskyu, S. Yarmoluk // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects October 1-4 2015, Kyiv, Ukraine. P.43.

14. Effect of the out-of-plane ligands on the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanine complexes / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // XIX конференція з неорганічної хімії за участю закордонних учених, 7-11.09.2014, Одеса, Україна, С.26.

15. Amino-substituted β -ketoenole dyes for fluorescent detection of amyloid fibril / S. Chernii, N. Akbay, V. Chernii, I. Tretyakova, Ya. Dovbiy, V. Kovalska // The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF), September 13-16 2015 Würzburg, Germany, P.99.

16. Anti-fibrillogenic activity of the phthalocyanine complexes: Role of the out-of plane ligands / V. Kovalska, S. Chernii, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2014), 23-30.08.2014, Lviv, Ukraine P.91-92.

17. Phthalocyanines with out-of-plane quinolinium styryl ligand as inhibitors of insulin amyloid fibrils formation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Cherepanov, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», 29-30.05.2014, Київ, Україна. - P. 25.

18. Phthalocyanines with axially-coordinated styryl-quinolinium ligand as anti-fibrillogenic agents / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. - P. 157.

19. Correlation of anti-fibrillogenic activity of hafnium phtalocyanines and their tendency to self-association / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytsky, V. Chernii, S. Yarmoluk // 14th International conference-school «Advanced materials and technologies» 27-31.08.2012, Palanga Lithuania. - P. 124.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1	29
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1 Амілоїдогенні білки: історія відкриття та структурні дані	29
1.2 Формування амілоїдних фібрил та залучення у патогенез.....	32
1.3 Інсулін та лізоцим як амілоїдогенні білки.....	36
1.4 Вплив на утворення амілоїдних фібрил та підходи до потенційної терапії	41
1.5 Токсичність амілоїдних агрегатів білків	43
1.6 Функціональні амілоїди.....	44
1.7 Методи дослідження амілоїдних фібрил	48
1.8 Інгібітори фібрилоутворення амілоїдогенних білків	51
РОЗДІЛ 2	57
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	57
2.1 Матеріали	57
2.2 Приготування стокових розчинів.....	57
2.3 Приготування робочих розчинів.....	58
2.4 Отримання фібрилярних білків.....	58
2.4.1 Отримання фібрилярного інсуліну.	58
2.4.2 Отримання фібрилярного лізоциму.	59
2.5 Контроль перебігу процесу фібрилоутворення.....	59
2.6 Отримання електронних спектрів поглинання.....	60
2.7 Ефективна концентрація інгібітору	60
2.8 Атомно-силова мікроскопія	61
2.9 Скануюча електронна мікроскопія	61

2.10 Динамічне розсіяння світла	62
2.11 Поверхнево підсилена раманівська спектроскопія	63
2.12 Підсилення флуоресценції поверхнею металу	63
2.13 Статистична обробка отриманих результатів	64
РОЗДІЛ 3	65
ДОСЛІДЖЕННЯ ІНГІБУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ФТАЛОЦІАНІНІВ НА ФІБРИЛОУТВОРЕННЯ СПЕКТРАЛЬНИМИ МЕТОДАМИ	65
3.1 Моніторинг кінетики формування амілоїдних агрегатів інсуліну людини та яєчного лізоциму	66
3.2 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію у реакції фібрилоутворення інсуліну.....	67
3.3 Інгібуюча активність фталоціанінів цирконію у реакції фібрилоутворення інсуліну.....	69
3.4 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально- координованими замісниками однакової хімічної структури у реакції фібрилоутворення інсуліну	72
3.6 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію з аксіально-координованими замісниками у реакції фібрилоутворення лізоциму	74
3.6.1 Зміни власної флуоресценції лізоциму протягом реакції амілоїдної агрегації у присутності фталоціаніну з хіноліновим стириловим фрагментом.	75
3.7 Інгібуюча активність фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку у реакції фібрилоутворення інсуліну	77
3.8 Визначення IC_{50} для обраних фталоціанінів на прикладі інсуліну	79
3.8.1 Визначення IC_{50} для PcHfPiromelit.....	80
3.8.2 Визначення IC_{50} для PcHfQStr та PcZrQStr.....	80
3.10 Стирилпіридинові флуоресцентні барвники як потенційні зонди для визначення амілоїдних фібрил інсуліну	82

3.11 Застосування методу підсилення флуоресценції поверхнею металу для підвищення чутливості триметинових ціанінових барвників	87
РОЗДІЛ 4.	96
ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ ФІБРИЛОУТВОРЕННЯ.....	96
4.1 АСМ дослідження інгібування процесу фібрилоутворення інсуліну та лізоциму.	96
4.1.1 Вплив фталоціаніну $PcHfCl_2$ на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.....	96
4.1.2 Вплив фталоціаніну $PcZrDbm_2$ на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.....	97
4.1.3 Вплив фталоціаніну $PcHfDbm_2$ на продукти реакції фібрилоутворення інсуліну на ранніх стадіях.....	99
4.1.4 Вплив фталоціаніну $PcHfQStr$ на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.....	101
4.1.5 Вплив фталоціаніну $PcHfQStr$ на морфологію продуктів фібрилоутворення лізоциму.....	105
4.2 СЕМ дослідження морфології продуктів фібрилоутворення інсуліну у присутності фталоціанінів та порфіразинів	108
4.3 Дослідження розмірів продуктів реакції методом динамічного розсіювання світла	111
РОЗДІЛ 5.	116
ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФТАЛОЦІАНІНІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ ТА МЕХАНІЗМУ ІНГІБУВАННЯ.....	116
5.1. Вплив агрегаційних властивостей фталоціанінів на їх інгібуючу активність.....	116
5.1.1 Агрегація фталоціанінів у водному буфері і ДМСО.....	116
5.1.2. Агрегація фталоціанінів гафнію в умовах реакції фібрилоутворення.	118

5.1.3. Вивчення взаємодії та механізму інгібування інсуліну інгібітором PcHfPiromelit та PcHfCl ₂	119
5.2 Поверхнево підсилена раманівська спектроскопія	122
5.3 Механізм інгібування досліджуваних комплексів	128
ВИСНОВКИ	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135
ДОДАТКИ.....	150

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСМ	–	атомно-силова мікроскопія
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДМФА	–	диметилформамід
ДРС	–	динамічне розсіяння світла
мІНС	–	мономерний інсуліну
мЛІЗ	–	мономерний лізоцим
ППРС	–	поверхнево підсилена раманівська спектроскопія
СЕМ	–	скануюча електронна мікроскопія
фІНС	–	фібрили інсуліну
фЛІЗ	–	фібрили лізоциму
AgNP	–	наночастинки срібла
HEWL	–	Яечний лізоцим
NMDA	–	N-метил-D-аспарагінова кислота
PcHfBtfa ₂	–	фталоціанін гафнію з бензоїл-1,1,1,-трифторацетоном
PcHfCl ₂	–	фталоціанін гафнію з атомами хлору
PcHfDHA ₂	–	фталоціанін гафнію з дегідроацетовою кислотою
PcHfPiromelit	–	фталоціанін гафнію з піромелітовою кислотою
PcHfPyr ₂	–	фталоціанін гафнію з 1-феніл-3-метил-4-бензоїлпіразолоном-5
PcHfQStr	–	фталоціанін гафнію зі стириловим хіноліновим барвником
PcMg	–	фталоціанін магнію
PcTS	–	безметальний фталоціанін тетрасульфонат
PcTS-Al ⁺³	–	безметальний фталоціанін тетрасульфонат алюмінія
PcTS-Cu ⁺²	–	безметальний фталоціанін тетрасульфонат міді
PcZn	–	фталоціанін цинку

PcZrDbm ₂	–	фталоціанін цирконію з дибензоїлметанатною групою
PcZrDHA ₂	–	фталоціанін цирконію з дегідроацетовою кислотою
PcZrLys ₂	–	фталоціанін цирконію з лізином
PcZrQStr	–	фталоціанін цирконію зі стириловим хіноліновим барвником
PVP	–	полівінілпіролідон
PzMg	–	поріразин магнію
PzZn	–	порфіразин цинку
SIF	–	шар нанчастинок срібла, вкритий полівінілпіролідоном
STE	–	трансмівна губчаста енцефалопатія
TTR	–	транстиретин
TRIS	–	тріс-оксиметил-аміно-метан

ВСТУП

Актуальність теми. До патогенезу багатьох захворювань, включаючи нейродегенеративні розлади та амілоїдоз, залучені білки, що здатні утворювати β -складчасті нерозчинні агрегати. За цих патологій специфічні білки або білкові фрагменти змінюють функціональну розчинну форму, агрегуючи у нерозчинні амілоїдні фібрили, що накопичуються в різних органах і тканинах. На сьогодні відомо близько 20 різних білків, що формують токсичні амілоїдні відкладення при патогенезі конформаційних захворювань людини [Uversky V., 2004, Eisenberg D., 2012]. Крім того, агрегація може відбуватись у білкових препаратах медичного призначення, а можливість блокування цього процесу дозволить запобігти аутоімунним ускладненням, викликаним їх введенням [Вережка С., 2008].

Також, амілоїди можуть виконувати важливі функції за фізіологічних умов, наприклад, вони є компонентом біоплівки бактерій, залучені у синтез меланіну в шкірі людини [Pham С., 2014]. Одна із ключових фізичних властивостей фібрил – жорсткість білкової структури – становить інтерес для створення функціональних матеріалів. Амілоїдні фібрили були запропоновані як структурні елементи для активних композитів, нанотрубок, гідрогелів, імітації структури кісток [Knowles T., 2016].

Отже, вивчення амілоїдних фібрил та розробка інструментів впливу на процес фібрилоутворення як для запобігання формування патологічних чи функціональних амілоїдів, так і для створення композитних матеріалів на їх основі є актуальним завданням. Серед підходів по впливу на фібрилоутворення можна виділити стабілізацію білка у функціональному стані, блокування та пригнічення процесу амілоїдної агрегації, руйнування сформованих амілоїдів [Shamsi T., 2017]. Раніше було визначено сполуки, що належать до класів поліфеноли, порфірини та фталоціаніни, які активно пригнічують процес фібрилоутворення [Churches Q., 2014,].

Макроциклічні сполуки фталоціаніни досліджуються в ряді біомедичних застосувань. Вони низькотоксичні, виявляють антибактеріальні властивості, запропоновані для фотодинамічної обробки крові з метою видалення вірусів, успішно використовуються у фотодинамічній терапії онкологічних захворювань. Для планарних фталоціанінів було показано високу антифібрилогенну та антипріонну активність завдяки їх здатності стабілізувати нетоксичні агрегаційні інтермедіати або нормальну ізоформу білка [Valiente-Gabioud A., 2016].

Фталоціаніни з аксіально-координованими замісниками мають ліганди, з'єднані з центральним атомом металу, що надає молекулі об'ємну структуру. Вперше висока інгібуюча активність фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками була виявлена у реакції фібрилоутворення інсуліну [Kovalska V., 2012]. Таким чином, дослідження фталоціанінових комплексів, що містять замісники різної хімічної природи, надасть інформацію про залежність між структурою та антифібрилогенними властивостями таких комплексів і дозволить створювати високоефективні інгібітори агрегації білків на основі цих макроциклічних сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем «Раціональний дизайн інгібіторів протеїназ як попередників лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0112U004110, 2013-2017 рр.) та «Раціональний дизайн активних сполук проти патогенних штамів мікроорганізмів, резистентних до лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0117U003914, 2018-2022 рр.), спільного проекту НАНУ-ТЮБІТАК №114Z464 (2015-2016 рр.), гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Дослідна й інноваційна програма імені Марії Складовської-Кюрі №645628 (2015-2018 рр.), індивідуального гранту Європейської федерації біохімічних товариств (2018 р).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є пошук інгібіторів амілоїдної агрегації білків (фібрилоутворення) серед макроциклічних металокомплексів (фталоціанінів, порфіразинів) об'ємної та планарної геометрії та вивчення їх взаємодії з мономерними та агрегованими білками.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити кінетику реакції агрегації амілоїдогенних білків за відсутності та у присутності макроциклічних комплексів різної геометрії (фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками, планарних фталоціанінів та порфіразинів магнію і цинку);

2. Дослідити продукти реакції агрегації амілоїдогенних білків у присутності досліджуваних металокомплексів;

3. Проаналізувати залежність інгібуючих властивостей металокомплексів від їх хімічної структури, типу центрального атома металу та наявності/природи аксіально-координованого ліганду;

4. Дослідити взаємодію мономерного білка та амілоїдних фібрил з фталоціанінами методом спектроскопії електронного поглинання. Проаналізувати залежність між здатністю фталоціанінів до самоасоціації в водних розчинах (π - π стекінг) та їх інгібуючими властивостями;

5. Дослідити взаємодію мономерного білка та сформованих фібрил інсуліну з аксіально-координованими фталоціанінами методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії;

6. Охарактеризувати в якості потенційних флуоресцентних зондів для визначення амілоїдних агрегатів білків серію стирилпіридинових барвників. Визначити можливість використання методу підсилення флуоресценції поверхнею металу для підвищення чутливості детекції амілоїдспецифічних зондів.

Об'єкт дослідження: інсулін та лізоцим, амілоїдні фібрили цих білків, макроциклічні комплекси (фталоціанани, порфіразини).

Предмет дослідження: процес амілоїдної агрегації білків, інгібуюча активність фталоціанінів та порфіразинів в реакції фібрилоутворення білків

інсуліну та лізоциму, взаємодія комплексів з мономерними та агрегованими білками.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія, електронна спектроскопія поглинання, атомно-силова мікроскопія, скануюча електронна мікроскопія, спектроскопія динамічного розсіяння світла, поверхнево підсилена раманівська спектроскопія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів та порфіразинів різної геометрії на процес фібрилоутворення білків. Серед досліджених фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками визначено вискоєфективні інгібітори амілоїдної агрегації білків. Крім того, показано, що досліджені комплекси в залежності від структури можуть перенаправляти процес агрегації у бік формування різних типів білкових агрегатів. Визначено, що здатність фталоціанінових комплексів до самоасоціації корелює з їх інгібуючою активністю в реакції фібрилоутворення білків. Вперше показано можливість використання фталоціанінів для визначення амілоїдних фібрил методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Проаналізовано вплив структурних особливостей, природи центрального атома металу, геометрії замісників макроциклічних комплексів на їх інгібуючу активність та запропоновано механізм інгібування.

Практичне значення одержаних результатів. Фталоціаніни з аксіально-координованими замісниками пропонуються як ефективні інгібітори амілоїдної агрегації (фібрилоутворення). Запропоновано інгібітори амілоїдної агрегації білків серед досліджених фталоціанінів з аксіально-координованими лігандами. Отримані результати важливі для дизайну антифібрилогенних агентів із необхідними властивостями на основі цих металокомплексів.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних даних, які викладені у дисертації, отриманий за безпосередньої участі здобувача. Автором самостійно досліджено інгібуючу активність фталоціанінових комплексів на амілоїдну агрегацію інсуліну та лізоциму, визначено значення ефективної концентрації інгібітору, досліджено агрегаційні властивості

фталоціанінів. Дані по атомно-силовій мікроскопії отримані у співпраці з В.В. Черепановим (Інститут фізики НАН України). Дані по скануючій електронній мікроскопії та спектроскопії динамічного розсіяння світла отримані у співпраці з Інститутом фізичної хімії ПАН (Варшава, Польща). Обчислення гідродинамічних розмірів популяції фібрил було здійснено к.ф.-м.н. с.н.с. М.Ю. Лосицьким. Дослідження поверхнево підсилених раманівських спектрів фталоціанінів здійснено спільно з к.ф.-м.н. с.н.с. М.Ю. Лосицьким та проф. М. Чулха в Університеті Єдитепе (Стамбул, Туреччина). Планування досліджень, обговорення, аналіз, інтерпретацію отриманих даних і підготовку публікацій до друку здійснено разом із науковим керівником д.б.н., пр.н.с. В.Б. Ковальською.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на конференціях – практичний курс FEBS «Гідродинамічний та термодинамічний аналіз біологічних макромолекул та їх взаємодій» (Прага, Чехія, 2018), XI Парнасівська конференція - Форум молодих вчених «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (Київ, Україна, 2018), Міжнародна конференція «Нанотехнології та наноматеріали» (Чернівці, Україна, 2017), XXIII Міжнародна школа-семінар Галини Пучковської «Спектроскопія молекул та кристалів» (Київ, Україна, 2017), Міжнародна конференція 10ті Егейські дні аналітичної хімії (Чанаккале, Туреччина, 2016), VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, Україна, 2016), Нанобіофізика: фундаментальні та прикладні аспекти (Київ, Україна, 2015), XIX конференції з неорганічної хімії за участю закордонних вчених (Одеса, Україна, 2015), 14-а конференція «Методи та застосування у флуоресценції» (Вюрцбург, Німеччина, 2015), Міжнародна науково-практична конференція «Нанотехнології та наноматеріали» (Львів, Україна, 2014), Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2014), 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю

«Хімічні проблеми сьогодення» (Донецьк, Україна, 2014), 14-а Міжнародна конференція-школа «Передові матеріали та технології» (Паланга, Литва, 2012).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у наукових фахових журналах, а також представлено на 13 наукових конференціях у вигляді усних доповідей і стендових презентацій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини (3 розділів), висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота, що викладена на 156 сторінках, містить 45 рисунків та 14 таблиць. Список використаної літератури охоплює 165 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Амілоїдогенні білки: історія відкриття та структурні дані

У патогенез ряду розладів, включаючи амілоїдозу і нейродегенеративні захворювання, залучене формування впорядкованих білкових агрегатів, які називають амілоїдними фібрилами [1,2]. На сьогодні відомо близько 20 різних білків, що формують позаклітинні токсичні відкладення (амілоїди) і залучаються до патогенезу захворювань людини; ці білки відрізняються вторинною, третинною структурами та за амінокислотною послідовністю [3].

Термін «амілоїд» ввів Рудольф Вірхов у 1854 році для позначення виявлених у печінці при аутопсії макроскопічних тканинних аномалій, що давали позитивну реакцію на фарбування йодом та були помилково ідентифіковані як крохмальні. У 1959 році методом електронної мікроскопії було підтверджено фібрилярну структуру цих відкладень [4].

Незважаючи на структурні відмінності у будові білків, амілоїдні фібрили, що утворюються при різних патологічних процесах, мають багато спільних властивостей, зокрема β -складчастість просторової структури. Більшість амілоїдогенних білків, залучених до патогенезу, є порівняно невеликими за розмірами – до ~ 100 амінокислотних залишків, лише 4 мають більше 400 залишків, але жоден з них не перевищує 700 [5]. Амілоїдогенні білки мають різні характеристики четвертинної структури: можуть бути багаті на β -складки, α -спіралі або містити як α -спіралі, так і β -складки; мати глобулярну жорстку структуру, містити неупорядковані домени або належати до класу нативно розгорнутих (чи неструктурованих) білків[5]. Різні за структурою білки (α -

спіральні, β -структурні, нативно розгорнуті, $\alpha+\beta$, α/β , одно- або мультидоменні) однаковою мірою схильні до агрегації [6]. Серед амілоїдогенних білків є 13 неструктурованих (β -амілоїд, α -синуклеїн, тау-білок тощо), вони часто є продуктами протеолітичного розщеплення більших білків [5]. Немає явних подібностей в амінокислотних послідовностях, структурі або функціях амілоїдогенних білків [5]. Сформовані фібрили мають діаметр 7-13 нм та складаються з 2-8 протофіламентів кожен діаметром 2-7 нм. [5,7]. Протофіламенти у структурі фібрили можуть бути з'єднані латерально або скручені разом [8], хоча також описане формування однопротофіламентних фібрил [9]. Молекули амілоїдогенного білка утворюють β -складки, що розташовуються перпендикулярно довгій осі фібрили та формують β -шари [9–11]. Радикали амінокислот у складі фібрил утворюють так звані «канали зв'язування», що розташовуються вздовж довгої осі фібрили. Ширина такого каналу визначається відстанню між кожним другим радикалом амінокислоти та становить близько $\sim 6,5 \text{ \AA}$ [12]. Методом дифракції рентгенівських променів було встановлено, що відстань між сусідніми молекулами білка в складі фібрили $\sim 4,7 \text{ \AA}$ [10]. При нормальному скручуванні, β -шари розташовуються по колу навколо спільної осі, із періодом повторення $115,5 \text{ \AA}$ [10]. Загальні структурні елементи амілоїдних фібрил з'єднуються β -шарами з тисними інтерфейсами, позбавленим води. Така структура носить назву «стерична блискавка» [13,14]. Амілоїдні фібрили більш стабільні за інші білкові форми. Стабільність структури забезпечується «стеричними блискавками» між однорідними (гомостеричними) або неідентичними (гетеростеричними) β -шарами, тобто водневими зв'язками між шарами β -складок, утвореними внаслідок вивільнення раніше зв'язаних молекул води при утворенні «блискавки». Формат взаємодії бічних радикалів має форму «сходів» [14].

Амілоїдні фібрили як високомолекулярні полімери мають три загальні риси подібності – фібрилярна морфологія та β -складчастість просторової структури [5]. Також фібрили мають характерні тинкторіальні (барвник-зв'язувальні) властивості, що призводить до специфічної спектральної відповіді

флуоресцентного зонду [15,16]. Відмінності у структурі амілоїдних фібрил конкретних білків обумовлені відмінностями в амінокислотній послідовності та довжині ланцюгів та іншими факторами, включаючи умови формування розчину[17–19].

Енергію складного механізму згортання білка часто зображують як воронку, що звужується, оскільки кількість можливих варіантів конформацій білка зменшується з наближенням до нативного стану (термодинамічного мінімуму, рис. 1.1) [20]. При згортанні білка зменшується ймовірність помилки, оскільки більш бажана ентальпія стабільної конформації врівноважує падаючу ентропію [21]. Згідно літературних даних, амілоїдна форма білкової молекули може бути більш стабільною, ніж нативна конформація, навіть за фізіологічних умов [22–24].

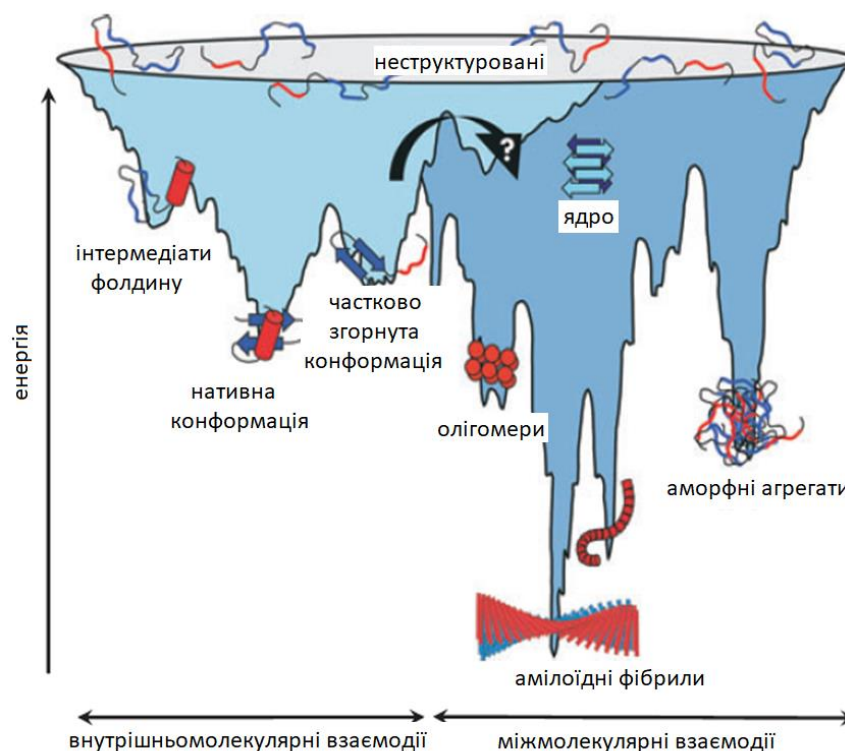


Рис. 1.1. Енергетична схема згортання та агрегації білка. Блакитний профіль термодинамічного мінімуму показує конформації, що формуються при згортанні нативного білка (переважають внутрішньомолекулярні взаємодії). Синій профіль показує конформації, що призводять до утворення аморфних агрегатів або амілоїдних фібрил (переважають міжмолекулярні взаємодії). Обидві частини енергетичного мінімуму перекриваються. Адаптовано до [25]

Для формування фібрилярних структур потрібна часткова денатурація конкретного білка (специфічного для кожного захворювання), в результаті чого білок набуває здатності до полімеризації з утворенням білкових філаментів – амілоїдних фібрил. Окремі білки в процесі формування амілоїдних фібрил взаємодіють певними ділянками своєї будови, що називають амілоїдогенними послідовностями. Виділяють 2 класи амілоїдогенних послідовностей: послідовності з гідрофобними сегментами та послідовності, збагачені на глутамін та аспарагін [26]. Гідрофобні, ароматичні амінокислотні залишки у амілоїдогенних послідовностях сприяють агрегації, бо гідрофобні взаємодії розглядаються як ключовий фактор утворення амілоїдних агрегатів [27].

1.2 Формування амілоїдних фібрил та залучення у патогенез

В основі молекулярного механізму амілоїдної агрегації лежить просторова перебудова певного білка (специфічного для кожного захворювання), в результаті чого білок набуває здатності до полімеризації з утворенням білкових філаментів – амілоїдних фібрил. Альтернативними варіантами агрегації є формування олігомерів або неупорядкованих структур [28]. Вибір між трьома шляхами агрегації: фібрилоутворенням, формуванням аморфних агрегатів або олігомеризацією, – визначається амінокислотною послідовністю і особливостями білкового оточення (рис. 1.2).

Агрегація відбувається, коли гідрофобні амінокислотні залишки чи фрагменти молекули частково згорнутих білків або інтермедіатів орієнтовані назовні замість того, щоб бути заглибленими у глобулу [21]. Фактори, що впливають на неправильне формування білків – це соматичні мутації, помилки транскрипції та трансляції, помилки у процесі згортання та у посттрансляційних модифікаціях, зміни внутрішньоклітинного середовища, температура, рН, старіння, оксидативний стрес і наявність іонів металів [29–31]. Існує ряд чинників, що служать важливими елементами у механізмі агрегації, а саме висока гідрофобність, схильність до утворення β -складок і низький сумарний

заряд [32–36]. Гідрофобні взаємодії є рушійною силою, що призводить до утворення неструктурованих агрегатів, олігомерів, амілоїдних фібрили [21].

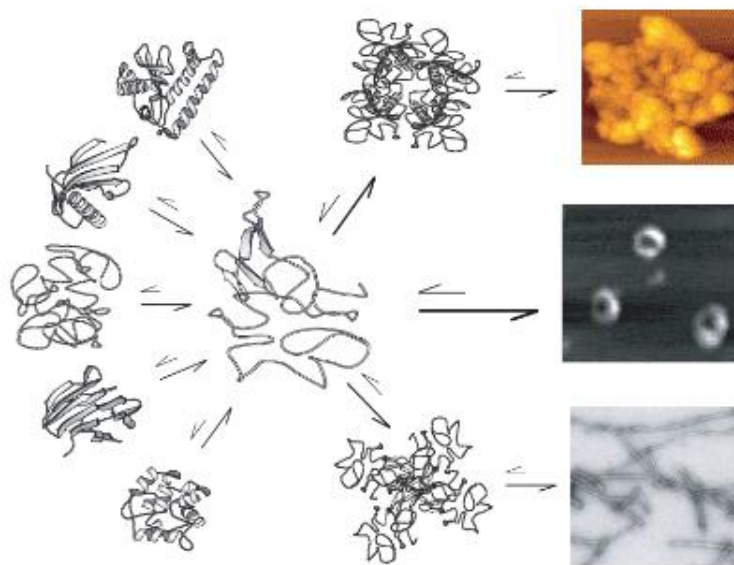


Рис. 1.2. Загальна модель агрегації білків. Структурно різні білки (α -спіральні, β -структурні, нативно розгорнуті, $\alpha+\beta$, α/β , одно- або мультидоменні) схильні до агрегації за певних умов (до формування амілоїдних фібрил, олігомерів або неупорядкованих структур). Адаптовано до [3]

Велика кількість амілоїдних фібрил структурно дуже різних білків була отримана *in vitro* [37]. Ці фібрили, що не залучені у патогенез захворювань людини, морфологічно та структурно не відрізнялися від тих, що сформовані білками, залученими у патогенез [38]. Отже, здатність формувати фібрили є загальною властивістю поліпептидного ланцюга; є багато білків, не причетних до патогенезу конформаційних захворювань, що потенційно здатні утворювати амілоїдні фібрили за сприятливих умов [39].

In vitro було показано, що наступні речовини та фактори також можуть викликати та сприяти агрегації амілоїдогенних білків: підвищені концентрації білків [40], висока іонна сила розчину [41], присутність глікозиламінів [42], іонів металів (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) [43], жиророзчинних сполук, пестицидів, гербіцидів [44] і поліамінів (путресцину, спермідину, сперміну) [41].

Щоб пояснити молекулярні основи формування амілоїдних фібрил, було запропоновано механізм фібрилоутворення, що виникає при дестабілізації жорсткої нативної структури білка та спричиняє формування частково розгорнутої конформації або амілоїдогенного інтермедіату [45]. Так як всі фібрили, незалежно від амінокислотного складу самого амілоїдогенного білка, мають загальну β -складчасту структуру, процес утворення цієї структури потребує значних конформаційних перебудов [3]. Третинна структура обмежує такі зміни, тому є необхідним формування частково розгорнутої конформації. Вважається, що така частково розгорнута конформація полегшує специфічні міжмолекулярні взаємодії, в тому числі електростатичні, гідрофобні та водневі, які є необхідними для олігомеризації і фібрилоутворення [46]. Для неструктурованих або частково неструктурованих білків, позбавлених вторинної структури, існує інша модель процесу агрегації у амілоїдні фібрили. Під час фібрилоутворення відбувається стабілізація частково згорнутої конформації, тобто у таких випадках має місце часткове згортання, а не розгортання [47].

Часткове розгортання призводить до утворення проміжних сполук (амілоїдних інтермедіатів, нуклеусів), які можуть перебудовуватися у олігомерні агрегати [48]. Ці ранні агрегати, як правило, досить нестійкі, оскільки у їх формуванні беруть участь лише відносно слабкі міжмолекулярні взаємодії, процес їх формування є зворотним – завершиться утворенням розчинного та близького до нативного стану (конформації) агрегату. Проте, при подальшому агрегатоутворенні, такі агрегати проходять внутрішню реорганізацію, утворюючи більш стабільні олігомерні агрегати, що мають β -складчасту структуру. Цей процес часто супроводжується збільшення компактності [49,50]. Ці β -структуровані олігомери здатні рости далі шляхом самозв'язування або шляхом додавання мономерів, часто з подальшою реорганізацією для формування фібрил з β -шарами та високим рівнем структурованості [5]. У випадку глобулярних білків, у формування залучені найбільш схильні до агрегації області молекул всередині гідрофобного ядра білка [5,51]. Внаслідок

часткового локального розгортання, теплових коливань або впливу ліганду відсутня необхідність перетинати енергетичний бар'єр [51].

Реакція фібрилоутворення вимірюється як функція часу шляхом моніторингу змін флуоресценції амілоїдчутливих барвників, таких як Тіофлавін Т [52]. Часто спостерігається сигмоїдна кінетика, що демонструє три фази – лаг-фазу (фазу відставання), експонентну фазу (також називається фазою зростання, елонгації, полімеризації або фазою фібрилоутворення), і рівноважну фазу (також називається фазою плато або насичення) [53,54].

У найпростішому випадку механізмом полімеризації мономерів або частково неупорядкованих конформацій є їх перетворення у нуклеуси (ядра нуклеації) через термодинамічно несприятливий процес, який відбувається на початку лаг-фази, а ріст протофіламентів відбувається шляхом додавання мономерів [53]. Такі ядра нуклеації можна розглядати як найменші структури, які здатні ініціювати подовження протофіламентів [53]. Ядра нуклеації мають конформацію, що сприяє швидкому агрегуванню [55].

Конформаційні захворювання амілоїдної природи – це група як правило невиліковних прогресуючих розладів, що включає нейродегенеративні хвороби Паркінсона, Альцгеймера, Гентінгтона, а також пріонні захворювання [28]. Також порушення нативної структури білка та утворення амілоїдних фібрил залучене до патогенезу таких захворювань, як діабет 2 та 1 типів, при яких формування амілоїдів відбувається у підшлунковій залозі [56] або локально у місцях введення інсуліну [57] та системні амілоїдоза, при яких амілоїдні агрегати формуються в багатьох органах, включаючи печінку, серце [21][58]. Білкові агрегати ініціюють кілька механізмів нейротоксичності: індукцію апоптозу позаклітинними агрегатами, загибель клітин через деполяризацію мембрани [59], індукцію окиснювального стресу через генерацію активних форм кисню [60].

До неструктурованих білків, що беруть участь у патологічних процесах, належать: α -синуклеїн (хвороба Паркінсона), β -амілоїд (хвороба Альцгеймера), острівцевий амілоїдний поліпептид (діабет 2 типу), тау-білок (хвороба

Альцгеймера, синдром Стіла-Річардсона-Ольшевського), кальцитонін (медулярний рак щитовидної залози). До α -спіральних належать білок гантінгтин (хвороба Гантінгтона) та аполіпропротеїн А1 (спадковий амілоїдоз нирок).

До β -складчастих білків, що мають схожу структуру [10] належать: транстиретин (сімейна амілоїдна полінейропатія) [61], легкий ланцюг імуноглобуліну (первинний системний амілоїдоз) [62], β_2 -мікроглобулін (гемодіаліз-асоційований амілоїдоз [63], фібриноген (спадковий амілоїдоз нирок) [64]. Також до спадкового амілоїдозу нирок залучені білки лізоцим ($\alpha+\beta$) [65] і гельсолін (α/β)[66].

1.3 Інсулін та лізоцим як амілоїдогенні білки

Як модельні білки для дослідження інгібіторів фібрилоутворення широко використовуються інсулін та лізоцим (рис. 1.3).

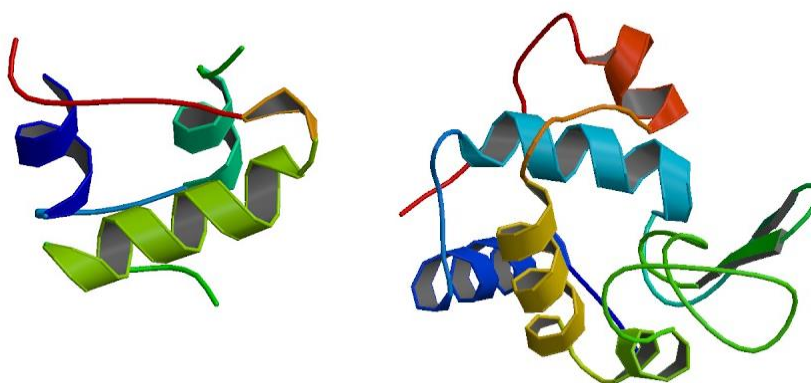


Рис. 1.3. Структура інсуліну (зліва, PDB ID 3I40) та лізоциму (справа, PDB ID 1GXV)

Інсулін – гормон, що синтезується бета-клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози, основною функцією якого є регуляція вуглеводного обміну. Суттєвим також є вплив на білковий і ліпідний обмін. Інсулінова недостатність, окрім гіперглікемії (підвищення вмісту глюкози в сироватці крові) і глюкозурії (наявність глюкози в сечі), які є характерними для патогенезу цукрового діабету, також викликає підвищений вміст у плазмі вільних жирних кислот, кетонурию (наявність у сечі кетонових тіл), кетонемію (підвищення

вмісту кетонів у крові) внаслідок збільшення інтенсивності ліполізу. В цілому, інсулінова недостатність призводить до численних порушень обміну речовин, ураження судин і патологічних змін у різних органах і тканинах.

Інсулін – альфа-спіральний білок, вагою 5808 Да, що складається з двох ланцюгів – А (21 залишок) і В (30 залишків) – з'єднаних між собою двома дисульфідними містками між залишками А7 і В7 і залишками А20 і В19. Третій дисульфідний місток з'єднує між собою 6 і 11 залишки А- ланцюга. Переважно, функціонально активною формою інсуліну є цинк-координований гексамер, утворений за рахунок асоціації трьох димерів і стабілізований трьома-чотирма іонами Zn^{2+} . Молекули інсуліну утворюють ізологічні димери за допомогою водневих зв'язків між пептидними групами залишків В24 і В26 двох мономерів, які при високих концентраціях, у свою чергу, реорганізуються в гексамери, що містять по два атоми цинку кожен. Координація іонів цинку відбувається за рахунок зв'язування з гістидином Н10 у В-ланцюзі. Його ізоелектрична точка становить 5,3. Інсулін містить дві амілоїдогенні послідовності (11)LVEALYL(17) у В-ланцюзі, яка відповідає за формування остову фібрили та (13)LYQLEN(18) у А-ланцюзі, що відповідає за латеральну агрегацію [67,68]. Амілоїдогенні послідовності інсуліну містять два залишки тирозину (рис. 1.4).



Рис. 1.4. Первинна структура інсуліну (амінокислотна послідовність)

У зв'язку з цим для інсуліну є характерним високий рівень латеральної агрегації із формуванням кластерів фібрил до 20 нм у діаметрі. Амілоїдогенна послідовність, що розташована у В-ланцюзі залучена у формування остову фібрили та збільшення її довжини, в той час як послідовність у А-ланцюзі відповідає за латеральну агрегацію і товщину сформованих фібрил. Амілоїдні відкладення фібрилярного інсуліну були виявлені у хворих на цукровий діабет [57], при нормальному старінні [69], а також після безперервної підшкірної

інфузії інсуліну і після багаторазових його ін'єкцій[43]. Проблеми, пов'язані з агрегацією, зустрічаються при виробництві і зберіганні інсуліну, а струшування при перевезенні також викликає агрегацію. Утворення фібрил – одна з основних проблем при комерційному виділенні і очистці генно-інженерного інсуліну людини, так як у більшості випадків основні стадії очистки проводять при значеннях рН нижче 5 [70].

Крім цього, інсулін досить часто використовується як модельний об'єкт: він був першим білком із встановленою амінокислотною послідовністю, першим із доведеною гормональною активністю. Інсулін є одним із найрозповсюдженіших модельних білків у дослідженнях, пов'язаних з агрегацією. Нещодавно було показано, що у пацієнтів з хворобою Паркінсона виявлена імунна відповідь на інсулінові молекули, що вказує на погіршення його гомеостазу [71].

Дослідження кінетики утворення інсулінових фібрил може надати важливу інформацію для запобігання фібрилоутворення. Було показано, що інсулін утворює агрегати при концентраціях, вищих 0,5 мг/мл у водних розчинах. В залежності від концентрації, рН, наявності іонів металів, іонної сили і складу розчинника, інсулін у розчинах існує у вигляді рівноважної суміші мономерів, димерів, тетраметрів і гексамерів і, можливо, вищих асоційованих станів. Інсулін, за низьких його концентрацій, відсутності іонів Zn^{2+} і при рН 2-8 є димером; при підвищенні рН або збільшенні концентрації до 1,5 мг/мл переходить у тетрамерну і гексамерну форми.

Утворення інсулінових фібрил – це фізичний процес, під час якого молекули інсуліну взаємодіють між собою, утворюючи лінійні біологічно неактивні агрегати (рис. 1.5). Фібрили мають середній розмір 21 Å, для них характерне скручування і переплетення.

Підвищена температура, низькі значення рН, органічні розчинники, перемішування і струшування призводять до дестабілізації і фібрилоутворення інсуліну. Підвищена температура потрібна для формування ядер нуклеації, а ріст фібрил може ефективно відбуватись і при нижчих температурних показниках.

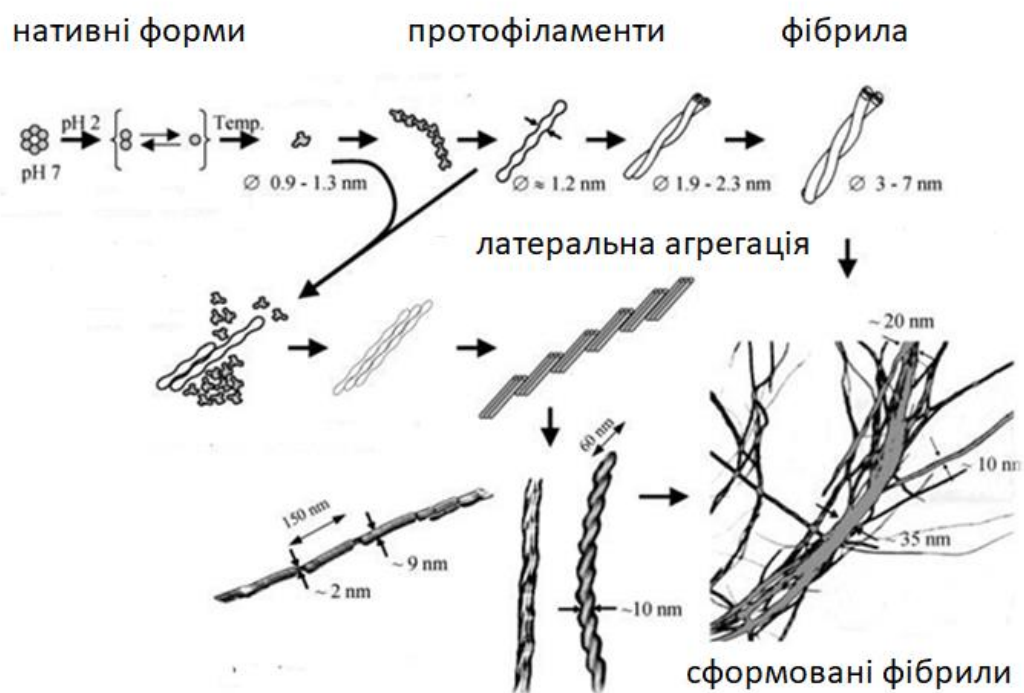


Рис. 1.5. Схема фібрилоутворення інсуліну. Адаптовано до [72]

Утворення критичних зародків і ріст фібрил інсуліну, як і у випадку інших білків, контролюється електростатичними і гідрофобними взаємодіями [72]. Роль цих взаємодій у процесі відображає ефект впливу іонної сили середовища. Зростання іонної сили призводить до збільшення швидкості утворення ядра нуклеації і уповільнення росту фібрил. Це явище може бути пов'язане з екрануючим ефектом аніонів. При рН 1,6 мономері інсуліну несуть позитивний заряд +6. Додавання хлорид-, сульфат-, фосфат-аніонів сприяє екрануванню позитивних зарядів і робить гідрофобні взаємодії більш вигідними. Гідрофобні взаємодії є необхідними для самоасоціації мономерів. Але при підвищенні концентрації аніонів електростатичні взаємодії між агрегатами і мономером, інтермедіатом чи розчинним олігомером екрануються іонами, що уповільнює ріст фібрил [73]. При додаванні денатуруючих агентів швидкість агрегації збільшується. Так, наприклад, сечовина пришвидшує фібрилоутворення навіть при рН 7,4. Також етанол і трифторетанол при низьких концентраціях унаслідок гідратації інсуліну збільшують швидкість фібрилоутворення. До стабілізуючих агентів належать триметиламін-N-оксид (ТМАО), сахароза та гліцерин [74].

Перемішування і струшування послаблюють вплив концентрації і іонної сили розчину на агрегацію і є важливими факторами при фібрилоутворенні, так як інсулін має схильність до утворення фібрил у присутності гідрофобних поверхонь, які утворюються при струшуванні. Перемішування призводить до швидкого фібрилоутворення навіть при нейтральному рН і низькій концентрації інсуліну [74]. Оскільки процес агрегації інсуліну достатньо вивчений, використання цього білка для пошуку інгібіторів агрегатоутворення є досить зручним.

Лізоцим – також відомий як мурамідаза або N-ацетилмурамід гліканігідролази – антибактеріальний фермент, що продукується тваринами, який є частиною вродженої імунної системи. Лізоцим являє собою глікозид гідролазу, яка каталізує гідроліз 1,4- β -зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну в пептидоглікані, що є основним компонентом грампозитивної клітинної стінки бактерій. Лізоцим є термічно стійким, з температурою плавлення досягаючи 72 °C при рН 5,0. Його ізоелектрична точка становить 11,35. лізоцим активний у великому діапазоні рН 6-9. Ячний лізоцим (HEWL), який є хорошою моделлю для вивчення структури випадкової котушки агрегує у амілоїдні фібрили при низькому рівні рН при додаванні етанолу. Амілоїдогенна послідовність (56)IFQINS(61) або її більша версія (49)GSTDYGILQINSRWWC(64) [75]. Амінокислотна послідовність лізоциму містить Туг та два Trp залишки (рис. 1.6).

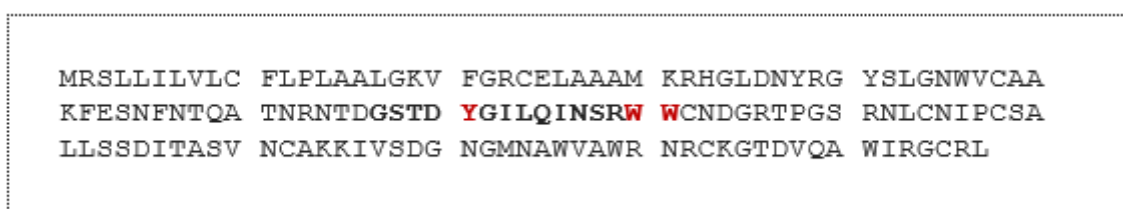


Рис. 1.6. Первинна структура лізоциму (амінокислотна послідовність)

Морфологічно амілоїдні фібрили лізоциму нерозгалужені діаметром 2-5 нм і довжиною 1-2 μ m. Вплив етанолу свідчить про те, що Asp та його залишки можуть відігравати важливу роль у патологічній амілоїдній агрегації [76].

1.4 Вплив на утворення амілоїдних фібрил та підходи до потенційної терапії

Насьогодні немає профілактичної терапії конформаційних захворювань і наявні терапевтичні підходи направлені на лікування симптомів, а не на основні причини захворювань. Відповідно, шлях агрегації амілоїдогенних білків являє собою актуальну мету для терапевтичного втручання. Таким чином, розуміння механізму формування амілоїдних фібрил та його інгібування має високу значимість. Кількість хворих на нейродегенеративні захворювання по всьому світу неперервно зростає, що створює несприятливу ситуацію. Вагому роль при патогенезі нейродегенеративних захворювань відіграє порушення нативної структури білка та формування амілоїдних агрегатів, особливо токсичних олігомерів [77,78].

Серед підходів, що направлені на запобігання патологічній агрегації білків, можна виділити наступні:

1. Стабілізація нативної конформації білка: неправильне згортання та амілоїдну агрегацію білків можна інгібувати молекулами, що здатні зв'язуватися з нативним білком, стабілізуючи його конформацію. Транстиретин (TTR) – білок з тетрамерною β -складчастою структурою, що переважно зустрічається в сироватці крові та спинномозковій рідині. Його функція – транспортування гормону тироксину (T4) та ретинолу [79]. Було показано потенційну здатність T4 інгібувати утворення фібрил TTR шляхом стабілізації функціонально активного тетрамеру [80].

2. Блокування процесу агрегації: підхід базується на блокуванні полімеризації фібрил після порушення нативної конформації білка. Припускається, що деякі молекули здатні вибірково приєднуватися до кінця фібрили та блокувати процес її подовження [81]. Короткі синтетичні пептиди вивчаються як блокатори подовження, зокрема самоідентифікаційний мотив на неправильно сформований білок [82]. У такого перспективного підходу є

суттєвий недолік: інгібітори також утворюють амілоїдні фібрили. Інгібування формування міжмолекулярних водневих зв'язків служить альтернативним підходом при блокуванні формування амілоїдних фібрил. Такі модифікації амінокислотних залишків, як N-метилування, обмежують утворення β -складок та формування амілоїдних агрегатів [83].

3. Зменшення кількості амілоїдних агрегатів: швидкість міжмолекулярного процесу агрегації суттєво залежить від концентрації. Найбільш ефективно процес агрегації можна заблокувати, зменшивши концентрацію проміжних продуктів, схильних до агрегації. Крім того, патогенез ряду захворювань (системний амілоїдоз тощо) супроводжується соматичними мутаціями, які призводять до зміни структури білка та збільшення концентрації таких проміжних сполук як розгорнута або частково розгорнута конформація. Існує два типи сполуки, що здатні перешкоджати агрегації білків [84]. Один клас включає в себе ті сполуки, що блокують мономерні взаємодії, а інший клас включає ті молекули, які зв'язуються з β -складками агрегатів і обмежують подальший ріст. Як інгібітори широко досліджуються ароматичні сполуки поліфеноли, порфірини та фталоціаніни [85].

4. Імунологічний підхід: було запропоновано використовувати антитіла проти амілоїдних агрегатів для зменшення їх кількості, використовуючи синтетичні агрегати β -амілоїду, що слугують антигенами [86]. На трансгенній тваринній моделі хвороби Альцгеймера було показано, що імунологічний підхід знижує формування амілоїдних відкладень та пошкодження мозку. Крім того, можна використовувати антитіла, що розпізнають конформаційні епітопи, присутні на олігомерних агрегатах, що згодом сприяє їх деградації [87].

5. Вплив наночастинок на агрегацію білків: було показано пригнічувальний вплив наночастинок на агрегацію β -амілоїду при хворобі Альцгеймера [88]. Наночастинок розміром <30 нм можуть долати гематоенцефалічний бар'єр, тому подальший синтез біосумісних наночастинок може забезпечити контроль амілоїдної агрегації при інших патологіях.

6. Використання білкових дезагрегаз: пропонується застосування ферментів, що здатні руйнувати амілоїдні фібрили та токсичні олігомери з відновленням функціонального стану нативного білка [89]. Дезагрегація білків може зменшити токсичні відкладення та компенсувати втрату функціональної активності білка, що була пов'язана з його агрегацією. Одночасне використання дезагрегації з подальшою деградацією білка можна застосовувати для повної ліквідації сформованих токсичних відкладень [89].

1.5 Токсичність амілоїдних агрегатів білків

Різниця у морфології амілоїдних олігомерів і амілоїдних фібрил забезпечує різницю токсичності цих агрегатів. Амілоїдні фібрили можуть бути утворені паралельними (α -синуклеїн, β -амілоїд тощо) або антипаралельними β -складками (амілін, гангінгін тощо) [90]. Дослідження показали, що олігомери переважно складаються не з β -складок, а містять вторинні фрагменти типу β -петля- β та третинну структуру β -шару як у сформованих фібрил.

В основі відмінностей у токсичності олігомерів та сформованих фібрил лежать їх структурні особливості: у олігомерів гідрофобні поверхні є частково відкритими, в той час як у фібрил вони приховані всередині мономерів, що взаємодіють; олігомери мають менший розмір, тож можуть легко дифундувати в тканинах у порівнянні з амілоїдними фібрилами; фібрили за своєю структурою є достатньо інертними, в той час як олігомери містять відкриті активні кінці, що можуть взаємодіяти з мішенями токсичності; олігомери є менш стійкими, в той час як фібрили є енергетично вигідним конформаційним станом [90].

Через структурні відмінності та подібність амілоїдних агрегатів (олігомерів та фібрил) було запропоновано загальний механізм клітинної токсичності, який полягає у взаємодії цих агрегатів з молекулами на плазматичній мембрані, які й виступають первинною мішенню для токсичності [91].

Сформовані фібрили взаємодіють з мембранними доменами, що збагачені гангліозидом GM1, в той час як олігомери взаємодіють з іонотропними NMDA-рецепторами глутамату. Було показано, що накопичення фібрил на GM1-мембранних рафтах викликає індуковане фібрилами порушення клітинної мембрани (без участі олігомерів) [91].

Напротивагу цьому, олігомери руйнують мембрани за рахунок стимулювання накопичення фосфоліпідів і сумарного негативного заряду мембрани. Також, олігомери α -синуклеїну збільшують мембранну проникність. Токсичність амілоїдних олігомерних агрегатів може також забезпечуватися впливом на кальцієвий гомеостаз. Подібного ефекту для сформованих фібрил не виявлено. Припускається, що олігомерні амілоїдні агрегати створюють на мембрані нові кальцієві канали, оскільки на них не впливають відомі інгібітори цих каналів. Іншим можливим поясненням може виступати збільшення провідності мембрани, а також зниження діелектричного бар'єру для транслокації іонів замість створення нових каналів [90].

Також було показано, що токсичний олігомер β -амілоїду Ab*56 взаємодіє з іонотропними NMDA-рецепторами глутамату, що призводить до збільшення NMDAR-залежного транспортування Ca^{2+} , і, як наслідок, до збільшення його внутрішньоклітинної концентрації та активації Ca^{2+} -залежної кальмодулін кінзаза IIa (CaMKIIa). Активована CaMKIIa сприяє збільшенню сайт-специфічного фосфорилування тау-білка, що залучений у прогресуванням хвороби Альцгеймера [92].

1.6 Функціональні амілоїди

Утворення амілоїдних фібрил спостерігається не тільки при патогенезі захворювань, вони також формуються за різних непатологічних умов для забезпечення організму корисними властивостями (рис. 1.7) [93]. Функціональні амілоїдні фібрили бактерій можуть виконувати такі важливі функції, як забезпечення морфологічної диференціації бактерій [94], адгезія до тканин

господаря [95], детоксикація токсичних сполук [96], електронний транспорт [97] та виступати структурним риштаком для біоплівки [98].

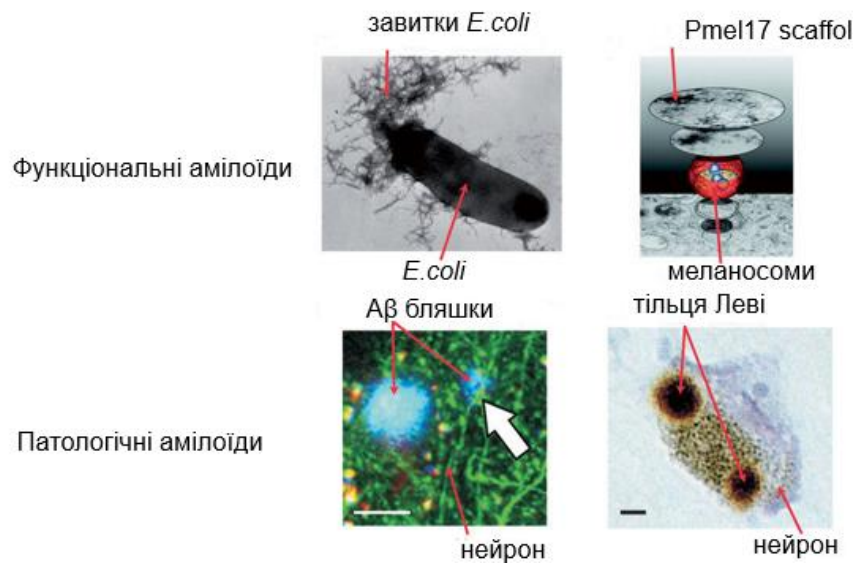


Рис. 1.7. Функціональні та патологічні амілоїдні фібрили

Бактерії збирають позаклітинні амілоїдні фібрили на мембрані своїх клітин. Для уникнення накопичення потенційно токсичних внутрішньоклітинних амілоїдних агрегатів, процеси секреції білкових субодиниць та їх збірки на мембрані мають бути строго скоординовані. Позаклітинні амілоїдні фібрили також становлять загрозу для життєдіяльності бактерій через високу схильність до агрегації і токсичність проміжних продуктів фібрилоутворення [99].

Білок кьорлі, перший ідентифікований позаклітинний функціональний амілоїд, продукується багатьма бактеріями, включаючи *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium* [100]. Кьорлі є основним білковим компонентом біоплівки *E. coli*, що важливий для колонізації поверхні і взаємодії з імунною системою господаря [101]. Формування кьорлі можна візуалізувати амілоїдчутливим барвником Конго Червоним [102]. Основна субодиниця кьорлі – CsgA – здатна самотійно полімеризуватися *in vitro* у β -складчасті амілоїдні фібрили, що не відрізняються від фібрил, утворених CsgA *in vivo* [103]. Гомологічні гени також знайдені у представників *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* і *Thermodesulfobacteria*, що вказує на те, що формування амілоїдних

фібрил є загальною стратегією, що забезпечує структурну цілісність та функціонування матриці біоплівки [93].

Для успішного формування біоплівки необхідна просторова й тимчасова регуляція збирання кьорлі, що потребує строгої координації експресії генів і біосинтезу білка. Специфічні гени кьорлі (*csg*) зустрічаються в двох оперонах, що транскрибуються в протилежних напрямках, міжгенна ділянка яких є сьомою за величиною в *E. coli* та складно регулюється [102]. Промотор *csgDEFG* є одним з найбільш складно регульованих промоторів в *E. coli*. Кьорлі в основному експресуються протягом стаціонарної фази і при низькій температурі (нижче 30°C), хоча деякі клінічні ізоляти можуть формувати амілоїди при 37°C. Обидва промотора кьорлі регулюються сигма-фактором (σ^S) стаціонарної фази та термочутливим білком *Crl*. Експресія з промотора *csgDEFG* також позитивно регулюється стаціонарним фазовим фактором транскрипції *MlrA* [99]. Субодиниці кьорлі, залучені у формування біоплівки *E. coli* наведені на Рис. 1.8.

Структурно та функціонально подібні до кьорлі позаклітинні фібрили описані у різних видів *Pseudomonas*, включаючи *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* і *P. putida*. У цих видів білкові компоненти амілоїдних фібрил кодуються опероном *farA-F*. *FarC*-білок було ідентифіковано як основний компонент амілоїдних фібрил, що також містилися у невеликій кількості субодиниці *FarB* і *FarE*, які необхідні для агрегації. *Far*-вмісні амілоїдні фібрили полегшують прикріплення до абіотичних поверхонь, а також забезпечують міцність матричної структури зрілої біоплівки, наприклад, в ризосфері рослин [93].

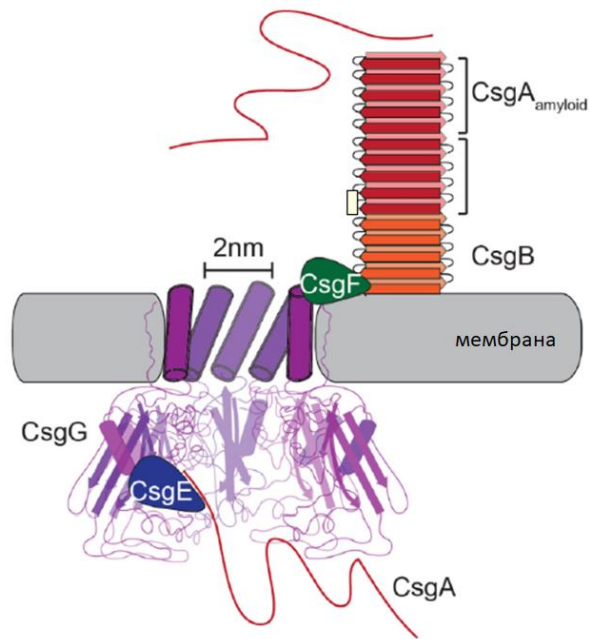


Рис. 1.8. Формування функціонального амілоїду кьорлі у біоплівці *E.coli*. CsgA – основна субодинаця курлі, CsgB – другорядна субодинаця курлі, CsgG – 8-субодинична пора, CsgE, CsgF, CsgC – залучені у регуляцію секреції та закріплення на мембрані. Адаптовано до [99]

Показано, що функціональні амілоїди також є частиною позаклітинного матриксу біоплівок, утворених бактеріями ґрунту *Bacillus subtilis* і *B. cereus*. Структура біоплівки містить білок TasA, що агрегує у амілоїдні фібрили, які утримують клітини разом і забезпечують структурну підтримку біоплівки. TasA експресується з оперона *tapA-sipW-tasA* разом з двома білками TapA і SipW, що залучені у формування амілоїдних агрегатів [93].

Ще одним прикладом позаклітинних фібрил, утворених полімеризацією мономерів, є фенолрозчинні модуліни (PSM) в *Staphylococcus aureus* (47). У позаклітинному середовищі PSM присутні або у вигляді розчинних пептидів, або у вигляді полімеризованих амілоїдних фібрил [93].

Підсумовуючи, функціональні амілоїди, зокрема у бактерій, виконують ряд важливих функцій: адгезія до абіотичних та біотичних поверхонь, міжклітинні взаємодії, структурний елемент біоплівок, знешкодження токсичних речовин, міжклітинний сигналінг, електронний транспорт. До

переваг саме функціональних амілоїдів можна віднести стабільність фібрил до денатуруючих агентів, стійкість до деградації протеазами та метаболічну вигідність полімеризації.

Саме біоплівки, компонентом яких є функціональні амілоїди, відповідальні за більше ніж 80% інфекцій [104]. Біоплівки до 1000 разів більш стійкі до антибіотиків, ніж вільноживучі бактерії. Більше того, біоплівки здатні уникати імунітету господаря. Бактеріальні амілоїди можуть підвищувати вірулентність бактерій, їх стійкість та можливості розповсюдження, індукувати або посилювати хвороби, пов'язані з патологічною агрегацією білків [105].

Пошук сполук, що перешкоджають формуванню біоплівок або знижують їх життєздатність є актуальним завданням. Серед підходів до пошуку таких сполук можна виділити наступні: пригнічення експресії генів (використання рифапентину тощо) [106], використання сполук, що мімікують під білки (піліпсини, FN075 тощо) [107], використання відомих інгібіторів амілоїдної агрегації, зокрема поліфенолів (епігалокатехін галат (EGCG), Тіофлавін Т, Конго Червоний тощо) [108], використання конформаційно специфічних антитіл (антитіло A11 для A β петиду) [109], використання синтетичних пептидів, що викликають агрегацію білків в цитозолі і, як наслідок, загибель клітин. Таким чином, відомі інгібітори амілоїдної агрегації становлять інтерес як агенти для перешкоджання формування біоплівок бактерій.

1.7 Методи дослідження амілоїдних фібрил

Одним із найбільш зручних методів дослідження та детекції білків є використання зовнішніх флуоресцентних зондів, що нековалентно зв'язуються з білками і продуктами їх денатурації чи агрегації за рахунок електростатичних і гідрофобних взаємодій. Крім того, β -складчасті амілоїдні фібрили білків також досліджуються та характеризуються методами трансмісійної електронної мікроскопії, атомно-силової мікроскопії, дифракції рентгенівських променів та твердофазного ядерного магнітного резонансу [110–112].

Зовнішні флуоресцентні барвники через їх специфічність використовуються у численних дослідженнях білків, наприклад, для контролю процесів розгортання і згортання, детекції проміжних конформацій, таких як розплавлена глобула, з метою оцінки гідрофобності поверхні, для вивчення активних центрів ферментів, характеристики процесів агрегації і фібрилоутворення, виявлення конформаційних змін, спричинених хімічною деградацією, для дослідження поверхнево-активних білкових взаємодій і аналізу білкових кристалів [113].

Основні флуоресцентні барвники, що застосовують для наступних досліджень: ANS, біс-ANS і Нильський Червоний – розгортання гідрофобної поверхні/згортання агрегованих структур; Тіофлавін Т і Конго Червоний – процеси фібрилоутворення, DCVJ – жорсткість навколишнього середовища. ANS і біс-ANS підходять для виявлення білкових агрегатів на ранніх етапах їх формування. Зазвичай це викликає певні складнощі у зв'язку з їх низькою концентрацією і коротким часом життя [113].

Для аналітичної оцінки амілоїдних фібрил, вивчення механізмів фібрилоутворення та їх кінетики зовнішні флуоресцентні зонди є досить чутливими.

Флуоресцентна спектроскопія з використанням Тіофлавіну Т вважається найбільш оптимальним методом виявлення інсулінових фібрил, але він не підходить для виявлення амілоїдних агрегатів лізоциму. Іншим прикладом застосування Тіофлавіну Т у наукових дослідженнях є визначення фібрилоутворення пріонного білка Sup35p [114] і протеїну L [113]. Використання барвника Конго Червоного дозволило встановити інгібуючий ефект на процес агрегації високих концентрацій етанолу і трифторетанолу. Флуоресцентні барвники специфічно підвищують інтенсивність флуоресценції та змінюють положення максимумів збудження та випромінювання флуоресценції у присутності агрегованих у β -складчасті агрегати білків.

На сьогодні для визначення активності інгібіторів фібрилоутворення інтенсивно застосовують саме Тіофлавін Т та Конго Червоний (рис. 1.9). За

допомогою цих барвників було виявлено ряд інгібіторів фібрилоутворення α -синуклеїну, що належать до різних класів хімічних сполук, зокрема флавонів, поліфенолів, катехол-вмістних сполук [85,115]. β -складчастий шар амілоїдних фібрил сформований таким чином, що кожний п'ятий ланцюжок білка має однаковий N-C-напрямок. Довжина молекули Конго Червоного складає $\approx 19 \text{ \AA}$, тому її негативно заряджені сульфатні групи зв'язуються з позитивно зарядженими залишками амінокислот у першому і п'ятому поліпептидних ланцюгах β -складчастого листа амілоїду. Наступна молекула барвника зв'язується з третім і сьомими ланцюжками тощо. Молекула Тіофлавіну Т має наступні лінійні розміри: довжина – $15,2 \pm 0,14 \text{ \AA}$, ширина бензотіазольної частини – $6,1 \pm 0,1 \text{ \AA}$, в той час як діметилзаміщеноїанілінової частини – $4,3 \pm 0,1 \text{ \AA}$.

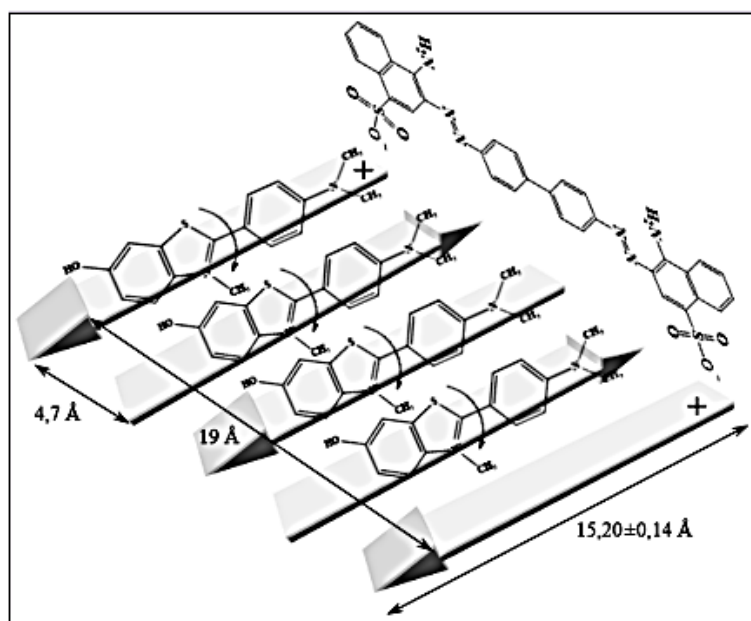


Рис. 1.9. Модель зв'язування Конго Червоного та Тіофлавіну Т з амілоїдними фібрилами. Адаптовано до [116]

Крім того, має місце обертання анілінового кільця щодо бензотіазольного. Вбудовування молекули Тіофлавіну Т в борозенки β -складки амілоїдної фібрили можливе внаслідок ідеальної комплементарності цих молекулярних структур. Фіксація молекули Тіофлавіну Т в борозенці β -шару припиняє обертання частин

цієї молекули, але не накопичення зовнішньої енергії в р-спряжених системах. Через відсутність можливості перетворення накопиченої енергії в механічне обертання, відбувається її випромінювання у видимому діапазоні (флуоресцентний відгук) [116].

У нещодавніх дослідженнях було показано, що триметиновий ціаніновий барвник 7519 (рис. 1.10) специфічно зв'язується з фібрилярними білками, зокрема, інсуліном, що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції [117]. Барвник 7519 демонструє кращу відтворюваність результатів, ніж Тіофлавін Т.

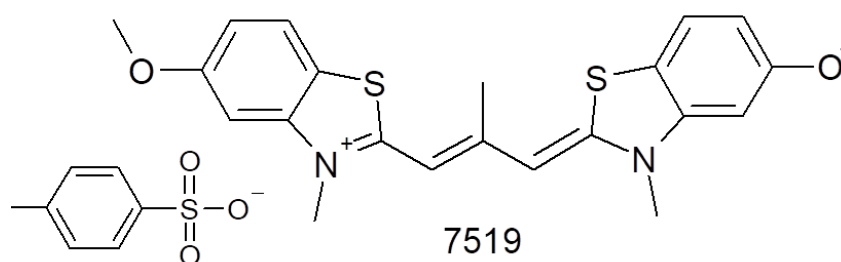


Рис. 1.10. Амілоїдчутливий триметиновий ціаніновий барвник 7519 [117]

На основі цього барвника було розроблено флуоресцентний метод вивчення активності інгібіторів фібрилоутворення. Саме цей метод застосовується у даній роботі для дослідження антифібрилогенної активності серії об'ємних макроциклічних металокомплексів.

1.8 Інгібітори фібрилоутворення амілоїдогенних білків

Процес агрегації білків у β -складчасті амілоїдні фібрили розглядається як одна з перспективних мішеней для розробки терапевтичних засобів лікування нейродегенеративних захворювань. Одним із підходів у пошуку нових препаратів є використання малих органічних молекул, що можуть пригнічувати або перенаправляти процес амілоїдної агрегації [118].

Сполуки, що належать до хімічних класів порфіринів, флавоноїдів, поліфенолів та фталоціанінів широко представлені як потенційні антиамілоїдогенні агенти [119].

Відомо, що ряд хімічних сполук інгібують формування агрегатів таких амілоїдогенних білків, як А β [120–123], тау [124], гантінгтину [125] та пріонних білків [126,127]. Зокрема, флавоноїд байкалін інгібуює фібриоутворення α -синуклеїну та руйнує сформовані фібрили [85]. Деякі поліфеноли, фенотіазини, порфірини, полієнові макроліди, Конго Червоний та його похідні інгібують утворення фібрил α -синуклеїну, β -амілоїду і тау-білка [85].

Такі природні поліфенолові сполуки, як марітимітин, лютеолін і трансилітин виявляли інгібуючу активність на агрегацію β -амілоїду [115]. У присутності марітимітина та лютеоліна формувались протофібрилярні агрегати, у той час як за дії трансилітину утворювались глобулярні олігомери з діаметром 10 нм.

Природні сполуки таншинони I and II також запобігали формуванню фібрил β -амілоїду (послідовністю із 42 амінокислот) [128]. При інгібванні цими сполуками спостерігалось утворення малих сферичних агрегатів та тонких протофібрил. Серед ефективних інгібіторів амілоїдної агрегації β -амілоїду (послідовністю із 40 амінокислот) також повідомляється про куркумін [129]. У присутності ексифона (поліфенол) та метиленового синього (фенотіазин) спостерігається інгібування утворення фібрил тау-білка [129].

Тафамідіс є лікарським засобом для поліпшення стану при транстиретиновому амілоїдозі (також відомому як сімейна амілоїдна полінейропатія), рідкісному, але смертельному захворюванні. Препарат був схвалений Європейським агентством з лікарських засобів в листопаді 2011 року. Функція тафамідісу полягає у стабілізації функціональної тетрамерної форми TTR [80]. У пацієнтів з амілоїдозом, TTR дисоціює в процесі, що сприяє агрегації та формуванню амілоїдних фібрил, що викликає спочатку збій нервової системи (нейродегенерацію), а потім відмову серця. Успішна стабілізація тетрамерного TTR є доказом того, що саме процес утворення амілоїдних фібрил викликає це

захворювання, а лікування із застосуванням тафамідису різко уповільнює процес утворення амілоїдних фібрил і дегенерацію пост-мітотичних тканин.

Один із головних запропонованих механізмів інгібування утворення амілоїдних фібрил полягає в утворенні ароматичних взаємодій між фенольними фрагментами у молекулах інгібітору та ароматичними амінокислотними залишками у амілоїдогенних послідовностях [85].

Пошук інгібіторів цього процесу серед малих сполук з молекулярною масою менше 500 (за правилом п'яти) створює обмеження у проектуванні та синтезі таких сполук із заданими властивостями.

Циклічні тетрапіроли – це хімічний клас сполук, що включає в себе такі біологічно важливі молекули, як гем та хлорофіли; до них також належать порфірини та споріднені їм фталоціаніни, що мають спільну характеристику – планарність ароматичної кільцевої системи. Зокрема, було показано, що фталоціаніни демонструють антипріонну активність та пригнічують фібрилоутворення α -синуклеїну, тау-білка та β -амілоїду [130,131]. При цьому, поляризована π -електронна делокалізована кільцева система фталоціанінів є структурним елементом, який сприяє здатності цих молекул сильно і селективно зв'язуються з ароматичними залишками амінокислот у білках через π - π взаємодії.

Ці сполуки як потенційні інгібітори фібрилоутворення мають ряд важливих властивостей. Вони мають низьку токсичність, яка підтверджена дослідженнями з використанням тваринних моделей [28,119,127] здатні долати гемато-енцефалічний бар'єр [126], антибактеріальні властивості [119,132], запропоновані для фотодинамічної обробки крові з метою видалення вірусів, включаючи ВІЛ [126], успішно використовуються у фотодинамічній терапії онкологічних захворювань [133], мають добре документовані методики синтезу та структурні бібліотеки [119]. Більшість грамнегативних і грампозитивних бактерій можуть бути успішно фотоінактивовані водорозчинними фталоціанінами як сенсibilізаторами [134].

Показано, що порфірини та фталоціаніни мають високу антипріонну активність [135], оскільки інгібують *in vitro* утворення стійкого до протеаз

пріонного білка PrPres, який є критичним для патогенезу трансмісивної губчастої енцефалопатії (STE). Наявність у цих хімічних структурах планарної, поляризованої, гідрофобної центральної ароматичної системи, очевидно, і спричиняє подібну активність [126].

Функціональні групи закріплені на периферії планарного ароматичного макроциклу виступають як критичні елементи для фізико-хімічних властивостей фталоціанінів (їх розчинності у воді, схильності до самоасоціації) [130], а також для їх антифібрилогенної активності та зв'язування з білками.

За останні роки було опубліковано ряд робіт, присвячених дослідженню фталоціанінів як потенційних інгібіторів фібрилоутворення та залежності їхньої біологічної активності від хімічної структури. Найбільш дослідженим фталоціанініном є безметальний фталоціанін тетрасульфонат (PcTS).

PcTS (рис. 1.11) містить чотири групи сульфонової кислоти по периферії макроциклу, тоді як у центрі молекула може залишатися без ліганду або координувати іон металу. PcTS та порфірини в експериментах подовжували життя тварин, інфікованих STE, на 50%-300%, найвища терапевтична активність спостерігається при використанні PcTS [127]. Порівняльний аналіз між PcTS і різними метал-координованими PcTS показав, що безметальний PcTS і Ni²⁺-вмісний PcTS були найефективнішими антипріонними агентами, що запобігали прогресуванню захворювання, тоді як Al³⁺-вмісний PcTS не мав ніякого ефекту в порівнянні з контрольними тваринами [28].

Для PcTS було продемонстровано високу афінність до α -синуклеїну. PcTS пригнічував утворення фібрилярних агрегатів, що призводило до утворення коротких дендритних агрегатів, що мають невисоку токсичність. Було показано, що Cu²⁺-вмісний фталоціанін тетрасульфонат викликає олігомеризацію α -синуклеїну. Сульфогрупи у складі фталоціаніну необхідні для вищої розчинності у водному середовищі, а питання стосовно їх впливу на інгібуючу активність є дискусійним [136].

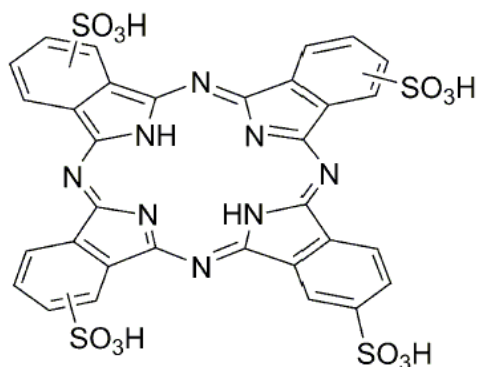


Рис. 1.11. Хімічна формула безметального фталоціаніну тетрасульфонату

Було показано, що кількість периферійних сульфогруп не має суттєвого впливу на антипріонну активність фталоціанінів, тоді як здатність фталоціанінів утворювати самоасоціати корелює з їх антипріонною та антиамілоїдогенною активністю. Al^{3+} -вмісний PcTS (фотосенс) має найменшу схильність до утворення молекулярних самоасоціатів, і, як наслідок, виявляє найнижчу активність [28][130]. Подібна кореляція спостерігається також при дослідженнях порфіринових сульфонатів, що координують залізо та марганець [28].

Пізніше було показано, що PcTS інгібує фібрилоутворення α -синуклеїну за рахунок специфічного зв'язування (стекинг-взаємодій) ароматичного фрагменту молекули металокомплексу з амінокислотним залишком тирозину Y39 в N-термінальній області білка [131]. Можливість фталоціанінів зв'язувати залишок Y39 α -синуклеїну корелює з їх антифібрилогенною активністю. Також було показано, що електростатичні взаємодії між негативно зарядженими сульфонатними групами фталоціаніну і позитивними фрагменти довкола сайту зв'язування PcTS (ймовірно, лізинами), може стабілізувати комплекс фталоціанін-білок [131]. PcTS також впливає на формування фірил тау-білка *in vitro* шляхом індукування утворення розчинних олігомерів, що характеризуються відсутністю α -спіралей або β -складок у його молекулярній структурі [137].

Також було показано здатність PcTS пригнічувати утворення тау-фібрил *in vitro* і на клітинних моделях шляхом селективної взаємодії з ароматичними

залишками тирозину Y197, Y310, Y394 та фенілаланіну F346, F378 тау-білка [138]. Аналіз структури-активності фталоціанінів показав, що їх антиамілоїдогенна активність залежить від типу іону металу, координованого з тетрапіррольним кільця, але не залежить від кількості периферичних заряджених замісників [119].

Фталоціаніни з позаплощинними лігандами – це тип металокомплексів, що має замісники, координовані до центрального атома металу. Це надає молекулі об'ємної структури порівняно із планарними порфіриновими і фталоціаніновими молекулами. Громіздкі замісники при зв'язуванні з центральним атомом помітно змінюють форму і розмір молекули, електричний розподіл заряду і геометрію валентних кутів. Нещодавно було досліджено серію фталоціанінів цирконію, що містять аксіально-координовані замісники як інгібітори фібрилоутворення [139]. Введення позаплощинних модифікацій дозволяє легко варіювати замісники у фталоціаніновій молекулі, яка зазвичай важко піддається хімічній модифікації по периферії макроциклу [139]. Модифікація молекули фталоціаніну шляхом уведення замісників (позаплощинних лігандів) до центрального атома металу дає змогу отримувати молекули із замісниками різної хімічної природи, що потенційно дозволяє проектувати терапевтичні засоби із заданими властивостями.

Отже, структурна основа для інгібуючої активності фталоціанінів на формування амілоїдних фібрил спирається на специфічні π - π взаємодії між ароматичною кільцевою системою цих молекул та ароматичними залишками в амілоїдогенних білках. Відповідно до літературних даних, схильність фталоціанінів до агрегації (самоасоціації) через ароматичне укладання корелює з їх здатністю зв'язуватися з білками та визначає їх ефективність як антиамілоїдогенних агентів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

У роботі були використані: інсулін людини виробництва «Sigma-Aldrich», США; інсулін людини виробництва «Індар», Україна; бичачий інсулін виробництва Sigma-Aldrich, США; яечний лізоцим виробництва «Sigma-Aldrich», США; соляна кислота вітчизняного виробництва; хлорид натрію вітчизняного виробництва; ДМФА (диметилформамід) та ДМСО (диметилсульфоксид) вітчизняного виробництва; TRIS (трис(гідроксиметил)амінометан) виробництва «Sigma-Aldrich» (США). Фталоціаніни гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками люб'язно надані Інститутом загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ. Фталоціаніни та порфіразини магнію та цинку люб'язно надані Інститутом фізичної хімії ПАН. Триметинові ціанінові барвники D51 та D151 люб'язно надані к.х.н., Д. В. Криворотенко, Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ. Стирилпіридинові барвники були люб'язно надані Д.І. Іншиним, Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ. Чистота всіх досліджуваних сполук була >95%. Амілоїдчутливий ціаніновий барвник 7519 люб'язно наданий Інститутом органічної хімії НАНУ. Наночастинки срібла AgNP синтезовані в Університеті Єдитепе, Туреччина.

2.2 Приготування стокових розчинів

Стоковий розчин мономерного інсуліну людини (концентрація 2 мг/мл, 340 μ M) готували, розчиняючи його наважку у 0,1 М HCl pH 2. Стоковий розчин мономерного яєчного лізоциму (концентрація 14,5 мг/мл, 1мM) готували шляхом

розчинення у 0,1 М НСІ рН 2. Стокові розчини фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками, фталоціанінів та порфіразинів цинку та магнію (концентрація 2 мМ) готували, розчиняючи їх наважки у ДМФА або ДМСО. Стокові розчини амліодчутливого барвника 7519 готували, розчиняючи його наважку у ДМФА (концентрація 2 мМ). 50 мМ TRIS-НСІ буфер рН 7,9 готували за наважками з каталогу з подальшою перевіркою та доведенням рН. Стокові розчини серії стирилпіридинових барвників та стокові розчини триметинових ціанінових барвників D51 та D151 барвників готували, розчиняючи їх наважки у ДМСО (концентрація 2 мМ).

2.3 Приготування робочих розчинів

Робочі розчини інгібіторів отримували розведенням стокових розчинів у 0,1 М НСІ рН 2 (кінцева концентрація 100 μ М). Робочі розчини флуоресцентних барвників отримували розведенням стокових розчинів у 50 мМ TRIS-НСІ буфер рН 7,9 (кінцева концентрація становила 2 μ М). Концентрація фібрилярних білків у робочих розчинах дорівнювала концентрації стокових розчинів мономерних білків (340 μ М для фібрилярного інсуліну, 1 мМ для фібрилярного лізоциму). В реакції фібрилоутворення до контрольної проби замість розчинів інгібіторів додавали еквівалентну кількість ДМФА або ДМСО. При дослідженні застосування стирилпіридинових та ціанінових барвників як флуоресцентних зондів до амліодних фібрил, концентрація мономерного та фібрилярного інсуліну у робочих розчинах становила 3,4 μ М (у 50 мМ TRIS-НСІ буфері рН 7,9).

2.4 Отримання фібрилярних білків

2.4.1 Отримання фібрилярного інсуліну.

Розчини інсуліну людини (2мг/мл або 340 μ М) та інсуліну бика (2 мг/мл або 340 μ М) у 0,1 М НСІ інкубували при 65°C у присутності та за відсутності

інгібіторів при постійному перемішуванні у одноразових поліпропіленових пробірках (типу «Eppendorf»). Загальний об'єм реакційної суміші у кожній пробірці – 300 μ л. Кожну реакцію амілоїдної агрегації здійснювали в декількох повтореннях. Процес фібрилоутворення вважався завершеним, коли зі збільшенням часу інкубації інтенсивність флуоресценції барвника 7519 не збільшувалась (близько 300 хвилин). Морфологію амілоїдних агрегатів було підтверджено методами атомно-силової мікроскопії та скануючої електронної мікроскопії.

2.4.2 Отримання фібрилярного лізоциму.

Розчин яєчного лізоциму (14,5 мг/мл або 1 мМ) у 0,1 М HCl інкубували при 65°C у присутності та за відсутності інгібіторів при постійному перемішуванні у одноразових поліпропіленових пробірках (типу «Eppendorf»). Загальний об'єм реакційної суміші у кожній пробірці – 500 μ л. Кожну реакцію амілоїдної агрегації здійснювали в декількох повтореннях. Процес фібрилоутворення вважався завершеним через 24 години. Морфологію амілоїдних агрегатів було підтверджено методом атомно-силової мікроскопії.

2.5 Контроль перебігу процесу фібрилоутворення

Аліквоти інкубованих сумішей досліджуваних білків відбирали з кожної пробірки у певний час від початкового моменту інкубації для проведення спектральних вимірювань з використанням амілоїдспецифічного барвника 7519. Аліквоту інкубованої суміші (10 μ л для інсуліну та 4 μ л для лізоциму) додавали до 1 мл 2 μ М розчину барвника 7519 у 50 мМ TRIS-HCl буфері, pH 7,9. Аліквоти інкубованого інсуліну відбирали на 0, 90, 150, 240, 300 хвилинах інкубації; аліквоти інкубованого яєчного лізоциму відбирали на 2, 8, 14, 17, 21 та 24 годинах інкубації. Амілоїдспецифічний барвник 7519 суттєво підвищує інтенсивність флуоресценції при зв'язуванні з β -складчастими структурами амілоїдних агрегатів. Флуоресценція барвника була збуджена, і інтенсивність флуоресценції зафіксована на довжинах хвиль 580(λ_{ex}) і 590(λ_{em}) нм, відповідно.

Для досліджуваних фталоціанінів значення інгібуючої активності визначалося за формулою $(1-I/I_0) \times 100\%$.

Спектри флуоресценції реєстрували на флуоресцентному спектрофотометрі «Cary Eclipse» (Varian, Австралія). Всі спектроскопічні вимірювання були зроблені відразу ж після змішування інкубованої суміші і розчину барвника. Для збудження флуоресценції використовували випромінювання імпульсної ксенонової лампи (потужність імпульсу 75 кВт). Усі виміри проводились у кварцовій кюветі (10×10 мм) при кімнатній температурі. Було досліджено спектрально-люмінесцентні властивості стирилпіридинових барвників. Довжину хвилі збудження та випромінювання флуоресценції вважали рівною довжині хвилі максимуму смуги збудження та випромінювання флуоресценції барвника у відповідному розчині.

2.6 Отримання електронних спектрів поглинання

Електронні спектри поглинання реєстрували на приладі «Specord M-40» (CarlZeiss, Німеччина), який має дві дифракційні ґратки по 1302 штрих/мм. Спектральний діапазон приладу становив 185-900 нм. Виміри проводили в кварцових кюветах (10×10 мм) при кімнатній температурі. Електронні спектри поглинання фталоціанінів були отримані у 50 мМ TRIS-HCl буфері рН 7,9 і в 0,1 М HCl (діапазон концентрацій 0,5-10 μМ), в ДМСО (концентрація 5 μМ) і в присутності 34 μМ мономерного або фібрилярного інсуліну контрольного зразка (концентрація 10 μМ). Як контроль для приладу друга кювета містила 50 мМ TRIS-HCl буфер рН 7,9.

2.7 Ефективна концентрація інгібітору

Концентраційно залежне інгібування процесу фібрилоутворення інсуліну обраними фталоціанінами здійснювалось шляхом інкубації розчинів білків в 0,1 М HCl у присутності різних концентрацій інгібітору (для PcHfPiromelit – 0; 0,5;

2; 10 або 100 μM , для PcZrLys₂ – 0; 4; 10; 40, або 100 μM , для PcHfQStr та PcZrQStr -0; 0,1; 0,5; 2; 10 або 100 μM) при 65°C протягом 5 годин. Ефективність інгібування фібрилоутворення в даній концентрації інгібітору оцінювали за зміною флуоресценції барвника 7519. Отримана експериментально залежність інтенсивності барвника від концентрації інгібітору I/I_0 апроксимувалась сигмовидною залежністю $Y=1/(1+(x/x_0)^{dx})$, де x_0 та dx – параметри апроксимації, які вираховувались програмою для мінімального відхилення апроксимуючої кривої від експериментальних даних. Наближений параметр x_0 відповідає шуканій концентрації IC_{50} , за якої спостерігається інгібування половини фібрил.

2.8 Атомно-силова мікроскопія

Дослідження продуктів реакції амілоїдної агрегації інсуліну та лізоциму методом атомно-силової мікроскопії (АСМ) проводили з використанням “Solver Pro M” системи NT-MDT (Росія). Зразок інкубованої суміші або сформованих фібрил з початковою концентрацією інсуліну 340 μM за присутності та у відсутності інгібіторів розводили в 30 разів бідистильованою водою. Після цього зразок наносили на сколоту атомно гладку поверхню слюди та промивали. АСМ проводили напівконтактним методом після повного випаровування розчинника. Для досліджень було використано зонди типу NSG01 (NT-MDT) та CSG30 (NT-MDT) (0,6 N/m, 48 kHz). Висоту фібрил вимірювали шляхом аналізу отриманих АСМ-зображень амілоїдних агрегатів, використовуючи пакету програм SPIP (Image Metrology A/S, Данія). Дослідження проводилися в Інституті фізики НАН України.

2.9 Скануюча електронна мікроскопія

Дослідження продуктів реакції амілоїдної агрегації інсуліну проводились методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) з використанням FEI NovaNano 450. Зразок сформованих фібрил з початковою концентрацією

інсуліну 340 μM за присутності та у відсутності інгібіторів розводили в 15 разів дистильованою водою. Після цього зразок наносили на скло, вкрите оксидом індію-олова та промивали. СЕМ проводили напівконтактним методом після повного випаровування розчинника. Використовувались параметри, що підходять для біологічних об'єктів: 5 кВ та 5-мм відстань. Дослідження проводилися в Інституті фізичної хімії ПАН (Польща). Довжину фібрил визначали, використовуючи програму Gwyddion.

2.10 Динамічне розсіяння світла

50 мМ TRIS-HCl буфер рН 7,9 був відфільтрований через 0,2 μm фільтр перед використанням. Зразок сформованих фібрил за відсутності та у присутності інгібіторів розводили відфільтрованим буфером до концентрації 27,2 μM та витримували на циркулюючій водяній бані при температурі $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ до повного видалення пухирців повітря. Експеримент проводився з використанням Brookhaven Instruments analyzer. Було отримано інтенсивність світла (лазер $\lambda = 632,8 \text{ nm}$), розсіяну зразком фібрил інсуліну на 6 кутах між 40° та 160° (40° , 60° , 90° , 120° , 140° для інсуліну у присутності фталоціанінів магнію та цинку, а також порфіразину магнію; 40° , 60° , 90° , 120° та 160° для вільного інсуліну та у присутності порфіразину цинку). Дослідження проводилися в Інституті фізичної хімії ПАН (Польща). У експерименті було отримано кореляційну функцію інтенсивності за часом $G^2(q, \tau)$, q визначене як $q = (4\pi n_0 / \lambda) \times \sin(\theta/2)$, що є функцією кута, де n_0 є показником заломлення, а τ - часом кореляції. Для отриманої функції $G^2(q, \tau)$ проводилась моноекспоненціальна апроксимація залежністю $G^2(q, \tau) = A + B \times e^{-\Gamma \tau}$, $\Gamma = Dq^2$ - швидкість затухання, а D - спостережуваний коефіцієнт поступальної дифузії. Результати представлені у вигляді залежності Γ/q^2 від q^2 . Засновуючись на значенні D , спостережуваний гідродинамічний діаметр фібрил можна оцінити як $d = kT / 3\pi\eta D$. Дослідження проводилися в Інституті фізичної хімії ПАН (Польща).

2.11 Поверхнево підсилена раманівська спектроскопія

Дослідження взаємодії фібрилярного інсуліну та фталоціанінів проводилися методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Спектри реєстрували, використовуючи систему InVia Reflex Renishaw Raman microscope (UK), оснащену діодними лазерами на 514 і 830 нм та 50× об'єктивом. Система автоматично була відкалібрована до піку кремнієвої пластини 520 cm^{-1} . Було використано лазерну потужність 3 мВт для вимірювання не підсилених раманівських спектрів та 0,3 мВт для вимірювання підсилених поверхнею раманівських спектрів. Для вивчення не підсилених спектрів фталоціанінів на скло наносили краплю розчину у концентрації 10^{-2} M у ДМФА та висушували. Для отримання поверхнево підсилених спектрів фталоціаніну у присутності та за відсутності фібрилярного інсуліну їх розчин додавали до суспензії наночастинок срібла AgNP (концентрація фталоціаніну $0,5\text{ }\mu\text{M}$, концентрація фібрил інсуліну $0,425\text{ }\mu\text{M}$, $0,142\text{ }\mu\text{M}$ та $0,0425\text{ }\mu\text{M}$). Дослідження проводилися в Університеті Єдитепе (Туреччина).

2.12 Підсилення флуоресценції поверхнею металу

Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі FS5 (Edinburgh Instruments), оснащеному ксеноновою лампою (потужність імпульсу 150 Вт). У всіх вимірах використовувалася передня підсвітка. Флуоресценція барвників була збуджена на довжині хвилі 530 нм. Вимірювання проводились при кімнатній температурі. Робочі розчини барвників (концентрація $100\text{ }\mu\text{M}$), фібрилярного інсуліну (концентрація $34\text{ }\mu\text{M}$) та фібрилярного лізоциму (концентрація $80\text{ }\mu\text{M}$) були отримані розведенням робочих розчинів у 50 mM TRIS-HCl буфері pH 7,9. Після цього, розчин вільного барвника та барвника у комплексі з фібрилою наносили на скло, вкрите наночастинами срібла AgNP та полівінілпіролідом (PVP). Як контроль використовували скло, вкрите PVP.

Спектри флуоресценції реєстрували після інкубації розчинів на склі протягом 30 хв. Дослідження проводилися в Університеті Меденіет (Туреччина).

2.13 Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel та пакету програм Origin. Загальноприйнятими методами підраховували показники середньої арифметичної (M), середнього квадратичного відхилення (σ) і середньої квадратичної похибки (e). Також, для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували парний двовибірковий t -тест Стюдента (t). Асимптотична значимість (p -значення) становила $p < 0,005$, $p < 0,002$, $p < 0,001$. Обробку та графічну ілюстрацію отриманих експериментальних даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 7.5.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ІНГІБУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ФТАЛОЦІАНІНІВ НА ФІБРИЛОУТВОРЕННЯ СПЕКТРАЛЬНИМИ МЕТОДАМИ

У даній роботі досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками різної хімічної будови на процес фібрилоутворення білків. Досліджувані сполуки містять наступні замісники: піромелітову кислоту (PcHfPiromelit), 1-феніл-3-метил-4-бензоїлпіразолоном-5 (PcHfPyr_2), бензоїл-1,1,1,-трифторацетон (PcHfBtfa_2), два атоми хлору (PcHfCl_2), хіноліновий стириловий фрагмент – *bis*-((E)-4-(3,4-дигідроксистирил)-1-метил-хінолінметилсульфат (PcHfQStr , PcZrQStr), дегідрацетову кислоту (PcZrDHA_2 , PcHfDHA_2), лізин (PcZrLys_2), дибензоїлметанатну групу (PcZrDbm) (рис. 3.1). Крім того, у роботі досліджено інгібуючу активність фталоціанінів та порфіразинів магнію та цинку планарної будови на процес фібрилоутворення інсуліну (рис. 3.1). У роботі також досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів з аксіально-координованими карбоксилатними замісниками різної природи (Додаток Б).

Кінетика фібрилоутворення білків у присутності та за відсутності інгібіторів контролювалась із використанням амліодчутливого флуоресцентного барвника 7519. Флуоресцентний барвник 7519 був збуджений, і випромінювання було зафіксоване на довжинах хвиль $580(\lambda_{ex})$ і $590(\lambda_{em})$ нм, відповідно. Кількість сформованих агрегатів оцінювалась шляхом вимірювання інтенсивності флуоресценції (I) амліодчутливого барвника 7519 на різних етапах фібрилоутворення у присутності інгібітору. Кількість фібрил за відсутності інгібітору взята за 100%, відповідно, інтенсивність флуоресценції барвника 7519 у контрольні моменти інкубації дорівнює I_0 . Таким чином, співвідношення I/I_0 вважається адекватним для оцінки кількості агрегованого

білка у присутності певної концентрації інгібітору $C_{інг}$ у порівнянні з неінгібованим процесом формування амілоїдних фібрил. Для досліджуваних фталоціанінів значення інгібуючої активності визначалося за формулою $(1 - I/I_0) \times 100\%$.

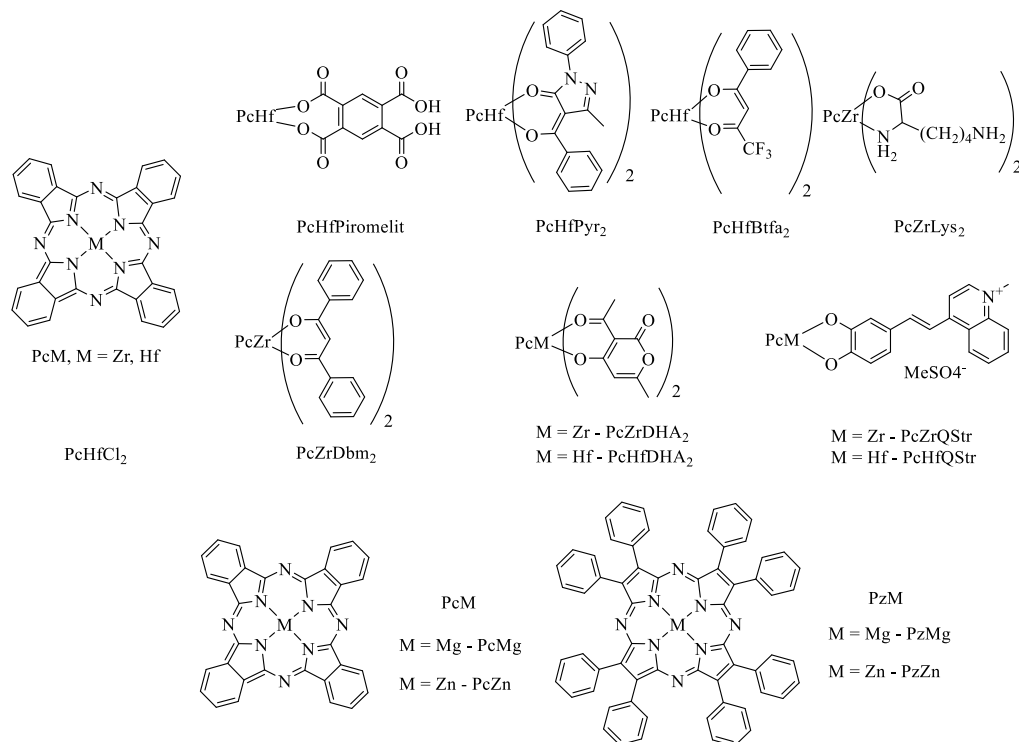


Рис. 3.1. Структура досліджуваних макроциклічних комплексів

3.1 Моніторинг кінетики формування амілоїдних агрегатів інсуліну людини та яєчного лізоциму

Реакції фібрилоутворення зазвичай виявляє сигмоїдну кінетику, що має три фази – лаг-фазу, експонентну фазу і рівноважну фазу. В кінетиці реакції фібрилоутворення інсуліну суттєве підвищення флуоресценції амілоїдчутливого барвника спостерігається від 90 хв інкубації із закінченням лаг-фази. Процес фібрилоутворення можна вважати завершеним, коли зі збільшенням часу інкубації інтенсивність флуоресценції барвника 7519 не збільшується (близько 300 хвилин). У випадку реакції амілоїдної агрегації лізоциму збільшення інтенсивності флуоресценції барвника спостерігається від 8 годин інкубації.

Після 20 годин інтенсивність флуоресценції суттєво не змінюється, що свідчить про завершення реакції (рис. 3.2).

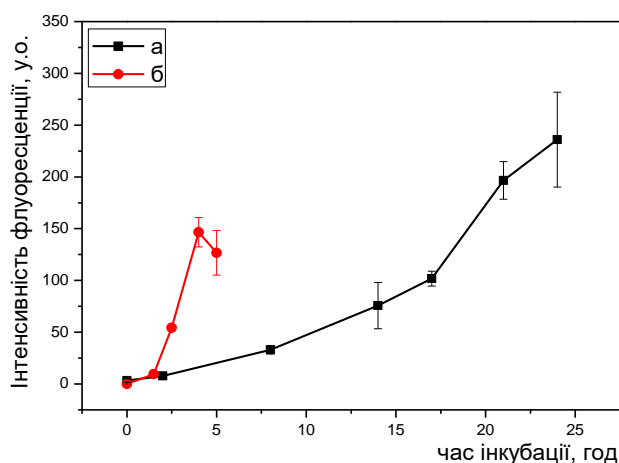


Рис. 3.2. Кінетика реакції амілоїдної агрегації (фібрилоутворення) досліджуваних білків інсуліну та лізоциму, $n=3$, а – кінетика амілоїдної агрегації яєчного лізоциму, б – кінетика амілоїдної агрегації інсуліну

Наявність фібрилярних амілоїдних агрегатів було підтверджено методами атомно-силової мікроскопії та скануючої електронної мікроскопії. Отже, сильний флуоресцентний відгук амілоїдчутливого барвника 7519 вказує на високий вміст β -складчастих структур в утворених агрегатах.

3.2 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію у реакції фібрилоутворення інсуліну

Було досліджено вплив на кінетику фібрилоутворення серії фталоціанінів гафнію, що містять піромелітову кислоту ($PcHfPiromelit$), 1-феніл-3-метил-4-бензоїлпіразолоном-5 ($PcHfPyr_2$), бензоїл-1,1,1,-трифторацетон ($PcHfBtfa_2$), два атоми хлору ($PcHfCl_2$) як аксіально-координовані замісники (рис. 3.1).

Протягом амілоїдної агрегації мономерного інсуліну за відсутності та у присутності фталоціанінів гафнію зміну інтенсивності флуоресценції барвника

7519 було зафіксовано на 90, 150, 240, 300 хв інкубації. Інгібуюча активність у кінцевий момент інкубації (300 хв) складала від 68 до 96%. Виявлено суттєву інгібуючу активність для $PcHfPiromelit$ та $PcHfCl_2$, яка на 150 хв для обоих становить 96%, а на 300 хв становить 96% та 94%, відповідно. Для $PcHfPyr_2$ інгібуюча активність на 300 хв становить 71% (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

**Оцінка потенційної інгібуючої активності фталоціанінів гафнію на
фібрилоутворення інсуліну у різні етапи фібрилогенезу з використанням
барвника 7519, n=3**

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				$(1-I/I_0) \times 100\%$			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, К (I_0)	2,8±0,4	160,0±5,9	380,3±20,2	536,7±57,0	—	—	—	—
Інсулін+ $PcHfPiro-Melit$	2,6±0,3	6,5±0,5****	16,7±0,9****	19,5±0,3***	8	96	96	96
Інсулін+ $PcHfVtfa_2$	17,3±3,5*	164,0±14,8	193,3±8,8***	168,9±4,7***	—	—	49	68
Інсулін+ $PcHfPyr_2$	2,7±0,4	166,7±10,6	274,3±8,7***	153,7±9,9***	5	—	28	71
Інсулін+ $PcHfCl_2$	1,3±1,0	5,0±2,3***	38,6±13,0**	31,6±16,0**	54	96	89	94
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519 (I)				Інгібуюча активність, %.			

Примітки: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; ** – $p \leq 0,02$ відносно контролю; *** – $p \leq 0,01$ відносно контролю; **** – $p \leq 0,001$ відносно контролю

$PcHfVtfa_2$ на 90 хв сприяє фібрилоутворенню, кількість агрегованих структур у його присутності збільшується у 6,1 разів відносно контролю. На 300 хв інгібуюча активність $PcHfVtfa_2$ становить 68%. Отже, за флуоресцентними даними на кінцевий момент інкубації інгібуюча активність фталоціанінів гафнію зменшується у ряду $PcHfPiromelit > PcHfCl_2 > PcHfPyr_2 > PcHfVtfa_2$ (рис 3.3).

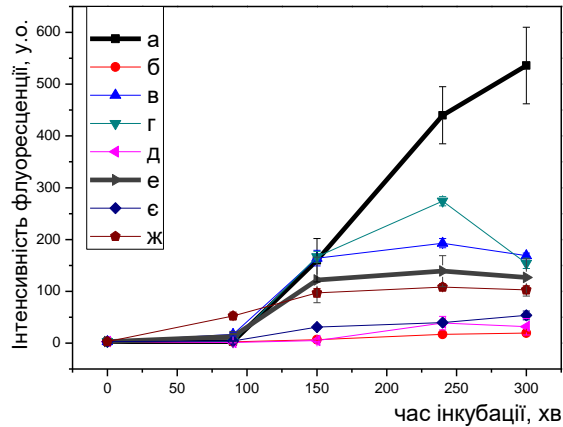


Рис 3.3. Кінетика амлоїдної агрегації (фібрилоутворення) інсуліну у присутності фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими лігандами різної хімічної структури; а – вільний інсуліну, б – PcHfPiromelit, в – PcHfBtfa₂, г – PcHfPyr₂, д – PcHfCl₂; е – вільний інсулін, є – PcZrLys₂, ж – PcZrDbm₂

3.3 Інгібуюча активність фталоціанінів цирконію у реакції фібрилоутворення інсуліну

Було досліджено серію фталоціанінів цирконію, що містять лізин (PcZrLys₂) та дибензоїлметанатні групи (PcZrDbm₂) як аксіально-координовані замісники (рис. 3.1).

Вища інгібуюча активність спостерігається для PcZrLys₂, що складає 58-95% протягом реакції. Для PcZrDbm₂ показано низьку інгібуючу активність протягом реакції фібрилоутворення інсуліну близько 20 % (таблиця 3.2, рис 3.3). За флуоресцентними даними на кінцевий момент інкубації інгібуюча активність для фталоціанінів цирконію зростає в ряду PcZrDbm₂ < PcZrLys₂.

Інтенсивність пригнічення фібрилоутворення аксіально-координованими фталоціанінами залежить від типу позаплощинного ліганду. Найвищу інгібуючу активність мають фталоціаніни гафнію з піромелітовою кислотою (PcHfPiromelit) та двома атомами хлору (PcHfCl₂).

Таблиця 3.2

**Оцінка потенційної інгібуючої активності фталоціанінів цирконію на
фібрилоутворення інсуліну у різні етапи фібрилогенезу з використанням
барвника 7519, n=3**

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, К (I ₀)	91,0±9,1	122,0±44,0	126,4±30,0	126,7±36,0	—	—	—	—
Інсулін+ PcZrLys ₂	4,0±0,1**	30,9±3,8**	39,8±3,9*	53,5±8,6*	95	75	68	58
Інсулін+ PcZrDbm ₂	52,6±7,3**	97,0±8,1*	108,0±6,7*	103,0±7,7*	42	20	20	22
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519(I)				Інгібуюча активність, %.			

Примітки: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; ** – $p \leq 0,02$ відносно контролю

Також було досліджено вплив на кінетику фібрилоутворення інсуліну фталоціанінів з аксіально-координованими карбоксилатними лігандами (Додаток Б). При дослідженні впливу фталоціанінів на кінетику формування амілоїдних фібрил інсуліну були використані різні розчинники для стокових розчинів (ДМСО та ДМФА), що пов'язано з низькою розчинністю сполуки Pc3 у ДМСО.

Інгібуюча активність для сполук Pc1 та Pc4 на кінцевий момент інкубації (300 хв) становить 81% та 83% (у ДМФА), відповідно (таблиця 3.3.).

Таблиця 3.3

Оцінка потенційної інгібуючої активності фталоціанінів (розчинник ДМФА) на фібрилоутворення інсуліну людини у різні етапи фібрилогенезу,

n=2

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, К (I ₀)	1,7±0,42	27,25±8,13	77±16,97	106±8,49	—	—	—	—
Інсулін+Pc1	4,0	2,5	4,4±0,85	20±8,49	-	91	94	81
Інсулін+Pc2	3,0	3,3±0,35	5,2±1,91	5,8±1,77	-	88	93	95
Інсулін+Pc3	3,6±2,90	1,8±0,35	2,0	2,9±0,14	-	94	97	97
Інсулін+Pc4	1,7±0,57	2,1±1,13	12,9±2,26	17,8±1,77	-	92	83	83
Інсулін+Pc5	2,4±0,85	3±71,20	5±1,41	10,0±2,83	-	87	94	91
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519 (I)				Інгібуюча активність, %.			

Інгібуюча активність для сполук Pc1 та Pc4 на кінцевий момент інкубації (300 хв) становить 61% та 85% (у ДМСО), відповідно (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4

Оцінка потенційної інгібуючої активності (розчинник ДМСО) на фібрилоутворення інсуліну людини у різні етапи фібрилогенезу, n=2

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, К (I ₀)	3,25±0,35	31,0±5,66	115±7,07	118,4±26,02	—	—	—	—
Інсулін+Pc1	2,4±0,85	2,9±0,64	7,8±6,01	46,1±12,73	-	91	93	61
Інсулін+Pc2	0,7±0,50	1,9±0,07	4,0±1,41	4,0	-	94	97	97
Інсулін+Pc4	2,0	4±1,41	7,3±1,06	7,9±2,9	-	87	94	85
Інсулін+Pc5	1,4±0,85	5,5±2,12	3,2±2,55	7,5±2,05	-	82	97	94
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519 (I)				Інгібуюча активність, %.			

Крім того, фталоціаніни Pc2, Pc3 та Pc5 частково осаджують інсулін протягом реакції фібрилоутворення. Тобто, співвідношення I/I_0 можна вважати адекватним для оцінки кількості агрегованого білка у інкубованій суміші лише у присутності сполук Pc1 та Pc4.

3.4 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками однакової хімічної структури у реакції фібрилоутворення інсуліну

Було досліджено інгібуючу активність фталоціанінів гафнію та цирконію із замісниками однакової хімічної структури на реакцію фібрилоутворення інсуліну. Фталоціаніни містять хіноліновий стириловий фрагмент (PcHfQStr, PcZrQStr) та дегідратетову кислоту (PcZrDHA₂, PcHfDHA₂) (рис 3.1).

Таблиця 3.5

Оцінка потенційної інгібуючої активності PcQStr та PcDHA₂ на фібрилоутворення інсуліну у різні етапи фібрилогенезу з використанням барвника 7519, n=3

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, K (I ₀)	9,5±2,1	54,3±0,7	146,6±14,1	126,0±21,6	–	–	–	–
Інсулін+ PcHfQStr	6,0±5,4	8,1±2,1*	14,5±1,4*	11,5±14,9	37	85	90	91
Інсулін+ PcZrQStr	8,5±1,2	10,7±0,3*	12,4±1,5*	10,5±2,1*	15	80	91	92
Інсулін+ PcZrDHA ₂	12,5±0,3	7,6±0,9	35,2±22,9	48,2±11,7	–	90	75	61
Інсулін+ PcHfDHA ₂	12,5±0,5	3,4±1,3*	39,6±25,0	40,8±33,1*	–	93	72	67
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519(I)				Інгібуюча активність, %.			

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю

Фталоціаніни з хіноліновим стириловим фрагментом з різними центральними атомами металів виявляють однаково високу інгібуючу активність, що на кінцевий момент інкубації складає близько 90% (таблиця 3.5, рис 3.4).

Значення інгібуючої активності для фталоціанінів $PcDHA_2$ є дещо нижчими і становлять 61% для $PcZrDHA_2$ та 67% для $PcHfDHA_2$. Отримані флуоресцентні дані можуть свідчити про відсутність впливу природи центрального атома металу на здатність цих сполук пригнічувати фібрилоутворення.

Було отримано електронні спектри поглинання досліджуваних фталоціанінів у вільному стані та у реакційній суміші, що відповідали структурно цілісним молекулам (дані не представлені).

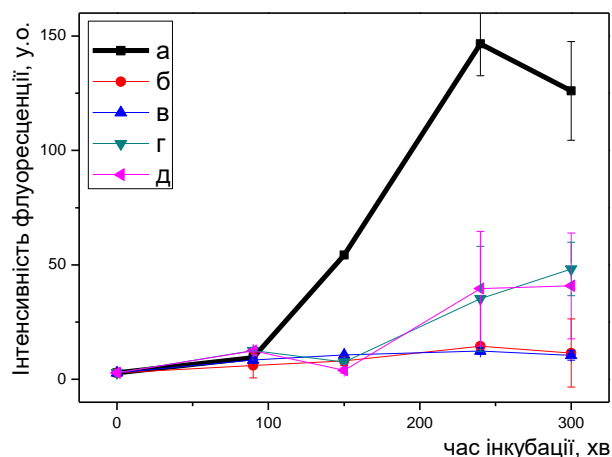


Рис. 3.4. Кінетика амілоїдної агрегації (фібрилоутворення) інсуліну у присутності фталоціанінів гафнію та цирконію із аксіально-координованими лігандами однакової хімічної структури; а – вільний інсулін, б – $PcHfQStr$, в – $PcZrQStr$, г – $PcZrDHA_2$, д – $PcHfDHA_2$

3.6 Інгібуюча активність фталоціанінів гафнію з аксіально-координованими замісниками у реакції фібрилоутворення лізоциму

Було досліджено процес агрегації яєчного лізоциму за відсутності та у присутності двох фталоціанінів гафнію, що містять в якості аксіально-координованих замісників хіноліновий стириловий фрагмент і два атоми хлору (таблиця 3.6, рис. 3.5).

Таблиця 3.6

Оцінка потенційної інгібуючої активності PcHfQStr та PcHfCl₂ на фібрилоутворення лізоциму у різні етапи фібрилогенезу з використанням барвника 7519, n=3

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	2 год	14 год	17 год	24 год	2 год	14 год	17 год	24 год
Лізоцим, К (I ₀)	7,8±2,1	75,7±22,4	101,7±18,1	256,0±45,9	—	—	—	—
Лізоцим+ PcHfQStr	8,9±4,3	33,0±4,2*	28,5±7,0	32,5±5,5*	—	56	72	87
Лізоцим+ PcHfCl ₂	7,0±1,0	18,0±14,7	22,9±15,1	44,6±5,0**	—	76	77	83
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519(I)				Інгібуюча активність, %.			

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю

На кінцевий момент інкубації обидва фталоціаніни виявляють високу інгібуючу активність, що становить 87% для PcHfQStr та 83% для PcHfCl₂.

Таким чином, відповідно до даних флуоресцентних досліджень, деякі з вивчених макроциклічних сполук суттєво впливають на перебіг реакції агрегації і суттєво зменшують кількість утворених β-складчастих структур для двох досліджуваних амілоїдогенних білків інсуліну та лізоциму, а у випадку інсуліну як модельного об'єкту інгібування реакції є більш вираженим.

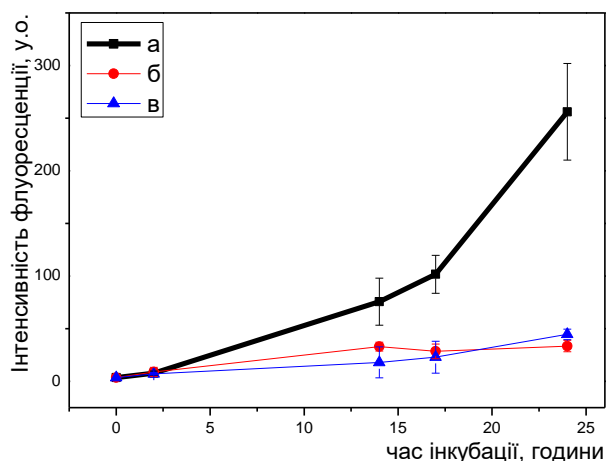
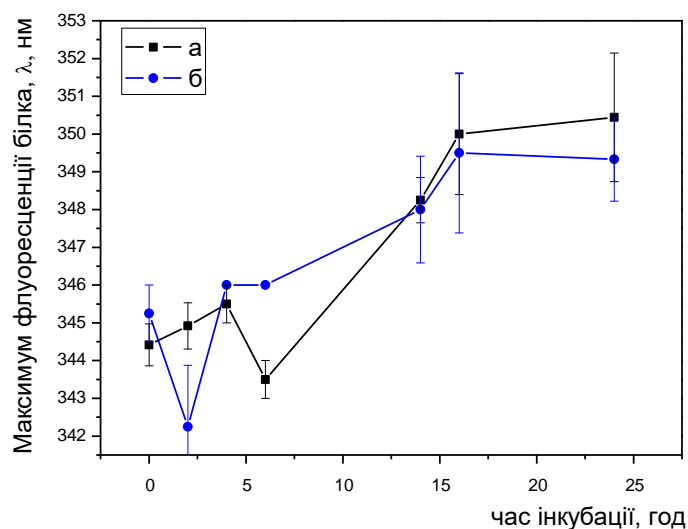


Рис. 3.5. Кінетика амілоїдної агрегації лізоциму у присутності фталоціанінів PcHfQStr та PcHfCl₂; а – вільний лізоцим, б – + PcHfQStr, в – + PcHfCl₂

3.6.1 Зміни власної флуоресценції лізоциму протягом реакції амілоїдної агрегації у присутності фталоціаніну з хіноліновим стириловим фрагментом.

Для оцінки впливу присутності інгібітору на конформаційні перебудови білка протягом реакції амілоїдної агрегації, було досліджено зміни власної флуоресценції лізоциму у присутності PcHfQStr. Власна флуоресценція лізоциму в основному забезпечується шістьма триптофановими залишками (Trp), два з яких знаходяться у амілоїдогенній послідовності (49)GSTDYGILQINSRWWC(64) [75]. Відомо, що параметри спектру флуоресценції Trp (тобто максимальна довжина хвилі та інтенсивність) сильно залежать від його оточення [140]. Таким чином, зв'язування макроциклічних молекул з білком, а також зміна конформації білка під час агрегації може впливати на флуоресценцію Trp. Подібні зміни параметрів флуоресценції (інтенсивність, максимум) дозволяють контролювати фібрилоутворення. Було досліджено зміни флуоресцентних характеристик лізоциму в процесі агрегації для вільного білка та у присутності фталоціаніну (рис. 3.6).

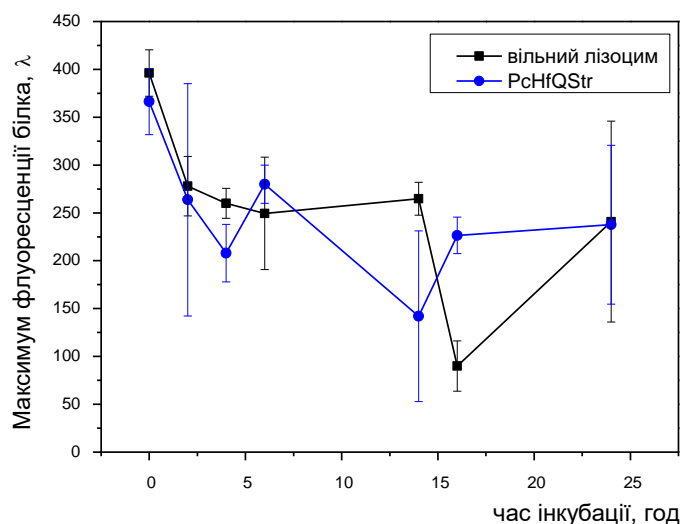
Додавання фталоціаніну несуттєво гасить власну флуоресценцію нативного лізоциму. Протягом агрегації, інтенсивність флуоресценції білка зменшується, досягаючи мінімального значення через 14-16 годин від початку реакції.



Максимум випромінювання флуоресценції (довжина хвилі, нм)

а – вільний лізоцим, б – + PcHfQstr

а



Інтенсивність у максимумі випромінювання флуоресценції (умовні одиниці)

а – вільний лізоцим, б – + PcHfQstr

б

Рис. 3.6. Залежність максимальної довжини хвилі спектру флуоресценції лізоциму від часу реакції агрегації за відсутності та у присутності фталоціаніну з хіноліновим стириловим фрагментом (PcHfQStr). Збудження флуоресценції білка 285 нм

Відмічено зсув максимуму флуоресценції лізоциму на ранніх стадіях у присутності фталоціаніну у короткохвильову область (через 2 години), тоді як для вільного лізоциму аналогічний зсув відбувся лише через 6 годин. У той же час подальша агрегація призвела до зсуву у довгохвильову область на 7-8 нм у порівнянні з положенням спектру нативного білка.

Це можна пояснити збільшенням гідрофобності середовища навколо Trp на ранніх стадіях реакції (синє зміщення), а потім зменшення гідрофобності, викликаного подальшою агрегацією (червоне зміщення) [141]. Різна поведінка вільного та інгібованого білка на ранніх стадіях реакції може свідчити про те, що білок утворює ранні інтермедіати, де частина Trp залишків більш екранована від водного середовища порівняно з вільним лізоцимом, а присутність фталоціаніну сприяє утворенню таких проміжних сполук. У подальшому, при утворенні зрілих агрегатів лізоциму Trp залишки стають більш відкритими. Наявність зсуву довжини хвилі максимуму флуоресценції Trp може свідчити про конформаційні зміни молекули білка на ранніх етапах фібрилоутворення та на взаємодію з фталоціаніновою молекулою.

3.7 Інгібуюча активність фталоціанінів фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку у реакції фібрилоутворення інсуліну

Було досліджено вплив на кінетику фібрилоутворення фталоціанінів та порфіразинів планарної будови, що не містять аксіально-координованих замісників. Відмінності у структурі фталоціанінів та порфіразинів полягають у координації різних центральних атомів металів, а також присутністю у структурі порфіразинів фенільних замісників по периферії макроциклу (рис. 3.1) Досліджені комплекси не змінюють тривалість лаг-фази кінетики фібрилоутворення інсуліну. Фталоціанін та порфіразин магнію $PcMg$ та $PzMg$ пригнічують інтенсивність фібрилоутворення інсуліну (в кінцевій точці реакції до 54% та 40%, відповідно). Фталоціанін та порфіразин цинку мають слабший

вплив на фібрилоутворення інсуліну порівняно з комплексами магнію. PzZn пригнічує утворення інсулінових фібрил приблизно на 11%, а PcZn на 17% збільшує інтенсивність реакції (таблиця 3.7, рис 3.7).

Відзначається, що природа атома металу впливає на інгібуючу активність у реакції фібрилоутворення сильніше, ніж геометрія периферії макроциклу. Інгібуюча активність зменшується у ряду PcMg > PzMg > PzZn.

Таблиця 3.7

Оцінка потенційної інгібуючої активності фталоціанінів та порфіразинів Mg та Zn на фібрилоутворення інсуліну у різні етапи фібрилогенезу з використанням барвника 7519, n=3

Вміст проби	Інтенсивність флуоресценції, у.о.				(1- I/I ₀)×100%			
	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв	90 хв	150 хв	240 хв	300 хв
Інсулін, К (I ₀)	13.7±9.4	80.9±39.5	104±30.6	100±28				
Інсулін+ PcMg	4.3±2.5	37.7±25	40.8±14.1	45.7±1.47				54
Інсулін+ PcZn	8.6±5.8	120.6±52.5	109.8±38.5	117.3±27.8				-
Інсулін+ PzMg	11.2±3.7	55.1±36.6	55.6±31.4	60.2±13.7				40
Інсулін+ PzZn	5.9±2.3	77.1±41.7	121.9±75	89±70				11
	Інтенсивність флуоресценції амілоїд-чутливого барвника 7519(I)				Інгібуюча активність, %.			

Примітка: * – p ≤ 0,05 відносно контролю

Досліджено можливість впливу взаємодії амілоїдчутливого барвника 7519 з комплексами металу на зміни інтенсивності флуоресценції барвника. Показано, що додавання макроциклічних комплексів несуттєво впливає на характеристики флуоресценції вільного барвника 7519 або його комплексів з інсуліновими фібрилами. Тому можна припустити, що взаємодія між макроциклічними

комплексами та барвником не відбувається, а зміни флуоресцентного відгуку барвника протягом реакції фібрилоутворення відображають формування β -складчастих агрегатів. Отже, різниця між активністю комплексів магнію та цинку за даними флуоресцентного аналізу, пов'язана з різною поведінкою комплексів (супрамолекулярним зв'язуванням) в реакції агрегації інсуліну і викликана ефектом «відкритого» центрального атому металу.

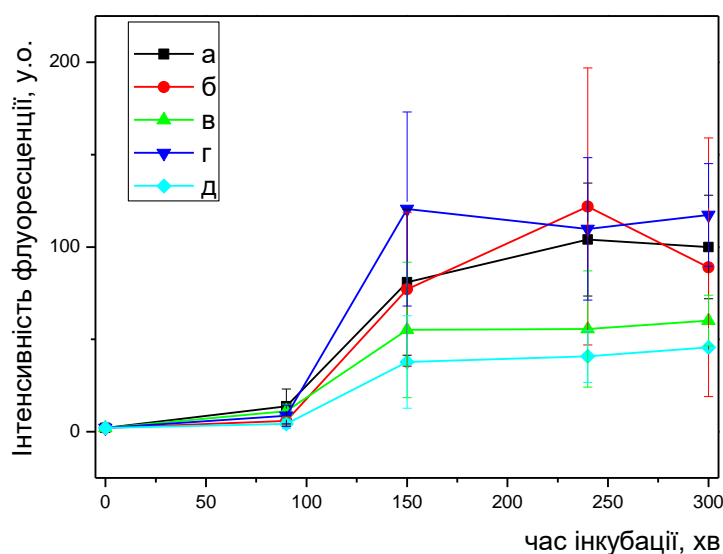


Рис. 3.7. Кінетика амілоїдної агрегації (фібрилоутворення) інсуліну у присутності фталоціанінів та порфіразинів планарної будови; а – вільний інсулін, б – PzZn, в – PzMg, г – PcZn, д – PcMg

3.8 Визначення IC_{50} для обраних фталоціанінів на прикладі інсуліну

З метою більш детального аналізу інгібуючої активності найефективніших із досліджених металокомплексів (PcHfPiromelit, PcZrQStr, PcHfQStr) було визначено ефективну концентрацію інгібування фібрилоутворення інсуліну. На основі цих даних оцінено ефективну концентрацію інгібітору, за якої кількість сформованих фібрил є вдвічі меншою відносно контролю (IC_{50}).

3.8.1 Визначення IC_{50} для $PcHfPiromelit$.

Графік залежності I/I_0 - показника, який відображає кількість агрегованого білка у присутності певної концентрації інгібітору, від концентрації інгібітору для $PcHfPiromelit$, наведено на рис. 3.8. Для досліджень використано наступні концентрації $PcHfPiromelit$ - 0, 0.5, 2, 10 або 100 μM (концентрація інсуліну 340 μM).

Отримана експериментально залежність інтенсивності барвника від концентрації інгібітору I/I_0 апроксимувалась залежністю: $Y = 1/(1 + (x/x_0)^{dx})$, де x_0 та dx – параметри апроксимації, які вираховувались програмою для мінімального відхилення апроксимуючої кривої від експериментальних даних. Наближений параметр x_0 відповідає шуканій концентрації IC_{50} , за якої спостерігається інгібування половини фібрил. Ефективна концентрація інгібітору складає $IC_{50} = 2,8 \pm 0,6 \mu M$.

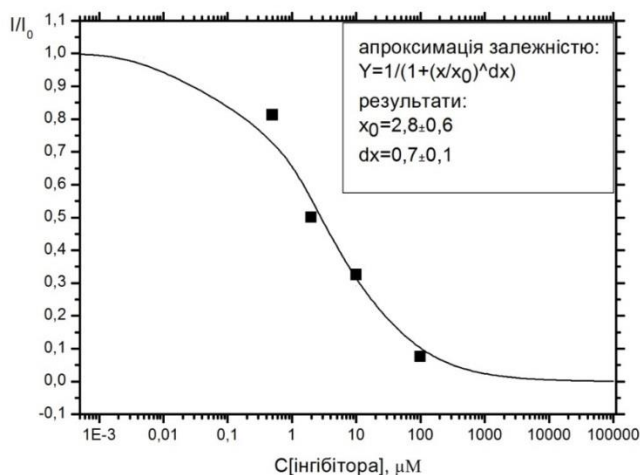
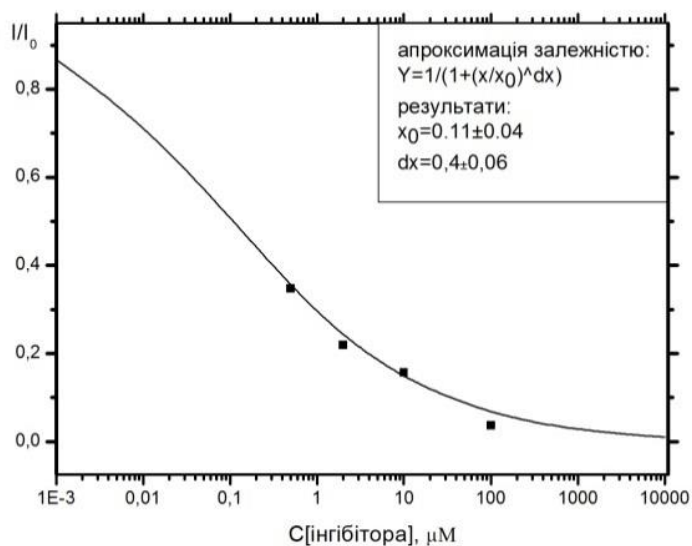


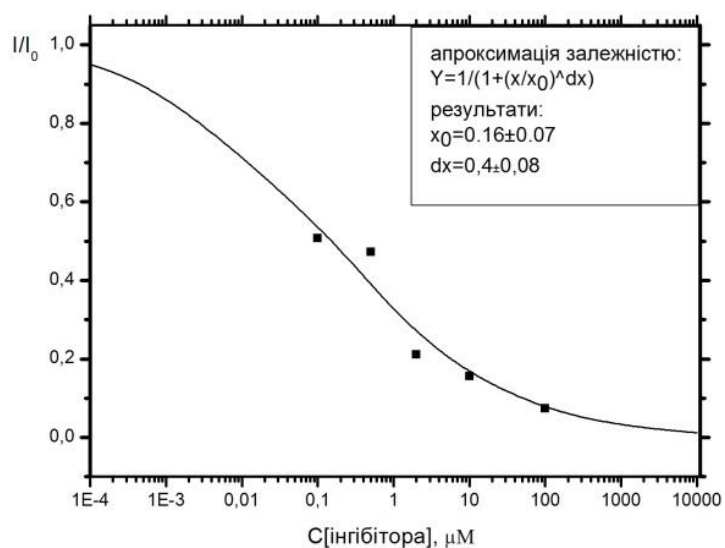
Рис. 3.8. Графік залежності I/I_0 від концентрації інгібітору амілоїдної агрегації. $C[PcHfPiromelit]=0; 0,5; 2; 10; 100 \mu M$, $C[інсулін]=340 \mu M$

3.8.2 Визначення IC_{50} для $PcHfQStr$ та $PcZrQStr$.

При визначенні IC_{50} використано наступні концентрації: для $PcHfQStr$ – 0; 0,5; 2; 10; 100 μM ; для $PcZrQStr$ 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 100 μM концентрації інгібітору
Рис.3.9а та Рис.3.9б.



a



б

Рис. 3.9. Графік залежності I/I_0 від концентрації інгібітору амілоїдної агрегації. $C[\text{PcHfQStr}] = 0; 0,5; 2; 10; 100 \mu\text{M}$ (а), $C[\text{PcZrQStr}] = 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 100 \mu\text{M}$, $C[\text{інсулін}] = 340 \mu\text{M}$ (б)

Оскільки зазначені фталоціаніни виявляли однаково високу інгібуючу активність, що становить близько 90%, було припущено, що природа «закритого» центрального атому металу не впливає на інгібуючу активність

аксіально-координованих фталоціанінів з хіноліновим стириловим замісником. При цьому, позаплощинний ліганд може відігравати вагому роль у антифібрилогенних властивостях цих макроциклічних комплексів. Встановлено, що значення IC_{50} для цих сполук є близькими та становлять $0,16 \pm 0,08 \mu\text{M}$ для PcZrQStr та $0,11 \pm 0,04 \mu\text{M}$ для PcHfQStr .

Отже, із близьких значень IC_{50} та однакових значень інгібуючої активності можна зробити висновок, що на здатність пригнічувати перебіг реакції фібрилоутворення суттєво впливає саме аксіально-координований замісник цих сполук та фталоціаніновий макроцикл. Натомість, центральний атом металу не впливає на інгібуючу активність фталоціанінів, оскільки є «закритим».

Слід зазначити, що значення IC_{50} для фталоціанінів гафнію та цирконію із хіноліновим стириловим фрагментом ($0,11$ та $0,16 \mu\text{M}$, відповідно) є значно нижчим, ніж IC_{50} для фталоціаніну гафнію з піромелітовою кислотою ($2,8 \mu\text{M}$) та фталоціаніну цирконію з лізином ($37 \mu\text{M}$) [139]. Це свідчить про важливість природи, структури та геометрії позаплощинного замісника для інгібування утворення амілоїдних агрегатів інсуліну.

3.10 Стирилпіридинові флуоресцентні барвники як потенційні зонди для визначення амілоїдних фібрил інсуліну

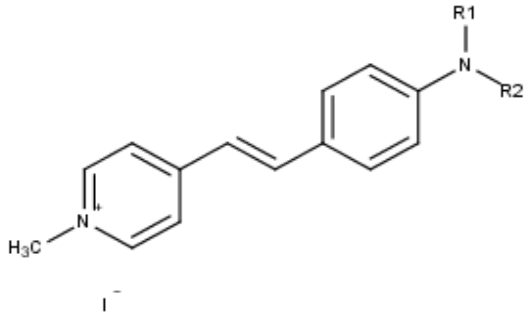
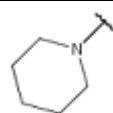
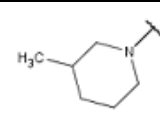
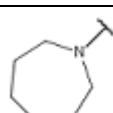
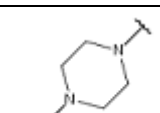
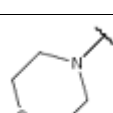
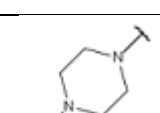
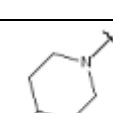
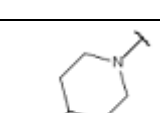
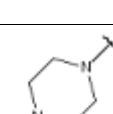
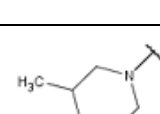
Було досліджено серію стирилпіридинових барвників як потенційні зонди для визначення амілоїдних фібрил інсуліну. Структури досліджуваних барвників представлені у таблиці 3.8.

Для вільних барвників Pa , Pa-Ph максимуми збудження флуоресценції знаходяться в діапазоні $400-420 \text{ нм}$, тільки максимум Pb зсунутий і розташований на 477 нм . Максимуми випромінювання флуоресценції барвників знаходяться у діапазоні $590-616 \text{ нм}$ (табл. 3.9). Тобто, барвники мають великі значення Стоксового зсуву ($137-206 \text{ нм}$).

Барвники виявляють слабку власну флуоресценцію з інтенсивністю в діапазоні 2,9-16,4 у.о., найбільша інтенсивність флуоресценції спостерігається для барвників Іе та Ії, 16,4 та 14,7 у.о., відповідно.

Таблиця 3.8.

Структури досліджуваних барвників

					
Структура барвника (R1, R2 – замісники, представлені нижче)					
№	Назва NR ₁ R ₂ групи	Структура NR ₁ R ₂ групи	№	Назва NR ₁ R ₂ групи	Структура NR ₁ R ₂ групи
IIa	piperidin-1-yl-		IIf	3-methylpiperidin-1-yl-	
IIb	azepan-1-yl-		IIg	4-[(tert-butoxy)carbonyl]piperazin-1-yl group	
IIc	morpholin-4-yl-		IIj	4-phenylpiperazin-1-yl-	
IId	4-methylpiperidin-1-yl-		IIh	4-benzylpiperidin-1-yl-	
IIe	4-methylpiperazin-1-yl-		IIi	3-methylpiperidin-1-yl-	

Барвники не змінюють свої флуоресцентні властивості у присутності мономерного інсуліну, що вказує на слабку або відсутню взаємодію між барвником та мономерним білком.

Таблиця. 3.9.

Флуоресцентні властивості 4- (4-діалкіламіностирил) піридинових барвників у вільному стані; у присутності мономерного та фібрилярного інсуліну

Барвник	Вільний барвник			Барвник + мономерний мІНС		Барвник + фібрили інсуліну фІНС				I ^Ф /I ⁰
	λ ^{ex} , нм	λ ^{em} , нм	I ⁰ , у.о.	λ ^{em} , нм	I ^М , у.о.	λ ^{ex} , нм	λ ^{em} , нм	ΔS	I ^Ф , у.о.	
Па	410	616	3.9	617	3.6	533	607	74	73.0	20.3
Пб	477	614	7.1	611	6.7	546	606	60	88.0	13.1
Пс	404	605	5.6	604	4.8	498	590	92	89.0	18.5
Пд	416	615	3.0	614	2.9	514	604	90	66.0	22.8
Пе	400	590	16.4	590	16.3	474	584	110	43.6	2.7
Пф	420	615	3.6	616	3.7	520	607	87	36.0	9.7
Пг	408	603	14.7	605	14.1	496	598	102	52.9	3.8
Пj	402	597	2.9	598	2.8	478	588	110	9.6	3.4
Пh	414	609	4.0	607	4.1	515	609	94	48.0	11.7

Примітки: λ^{ex} – максимум хвилі збудження флуоресценції; λ^{em} – максимум хвилі випромінювання флуоресценції; I⁰ – інтенсивність флуоресценції вільного барвника; I^М – інтенсивність флуоресценції барвника у присутності мономерного інсуліну (мІНС); I^Ф – інтенсивність флуоресценції барвника у присутності фібрил інсуліну (фІНС); ΔS – значення Стоксового зсуву; I^Ф/I⁰ – значення підвищення інтенсивності флуоресценції барвника

У присутності фібрилярного інсуліну відбувається суттєвий зсув максимумів збудження флуоресценції барвників у довгохвильову область (на 69-123 нм) порівняно з вільними барвниками. Також спостерігається зсув максимумів випромінювання флуоресценції барвників, але тільки до 15 нм.

Тобто, значення Стоксового зсуву меншуються для барвників у комплексі з фібрилярними агрегатами, однак залишаються досить значними (60-110 нм) (табл. 3.9, ΔS).

Барвники виявляють флуоресцентну відповідь на фібрилярні агрегати інсуліну: спостерігається підвищення інтенсивності від 2,7 разів для Пе до 22,8 разів для Пд барвника. Барвники Па та Пд з піперидиніл- та 4-метилпіперидинільними групами виявляють найбільш суттєве підвищення флуоресцентного сигналу (I_f/I_n) у присутності фібрилярного інсуліну у 20,3 та 22,8 рази, відповідно (рис. 3.10). Барвники Пе, Пг, Пj із низькою флуоресцентною відповіддю (2,7-3,8 рази) мають найбільші Стоксові зсуви (102-110 нм).

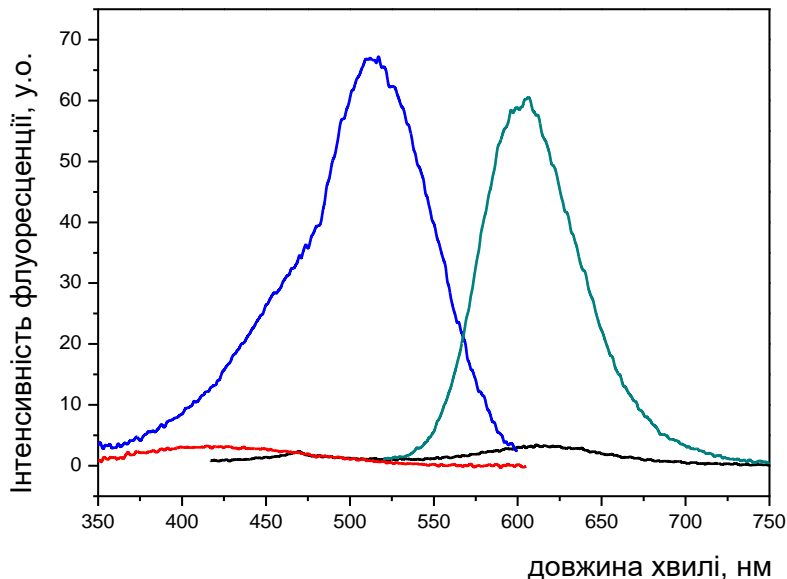


Рис. 3.10. Спектри збудження та випромінювання флуоресценції вільного барвника Пд (червона, чорна лінії) та у присутності фібрилярного інсуліну (синя, зелена лінії)

Крім того, було отримано лінійний діапазон детекції фібрил інсуліну для барвників IIa та IIд, які виявляють високу флуоресцентну відповідь. Для цього проведено титрування розчину барвника (концентрація 2 μM) фібрилами інсуліну (рис. 3.11 та 3.12). Нижня межа для виявлення фібрил інсуліну барвниками визначалася як рівна концентрації інсуліну, що призводить до збільшення інтенсивності флуоресценції вдвічі. Верхня межа діапазону визначення була встановлена як найбільша концентрація, при якій залежність інтенсивності флуоресценції барвника від концентрації фібрил залишається лінійною.

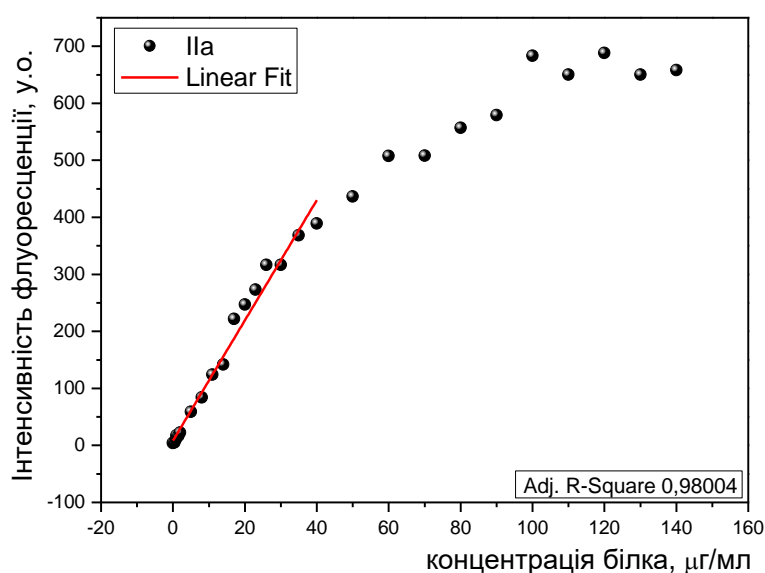


Рис.3.11. Титрування барвника IIa фібрилами інсуліну. Робочий розчин барвника 2 μM

Таким чином, концентрація барвників IIa та IIд 2 μM дозволяє флуоресцентне визначення фібрилярного інсуліну в лінійних межах концентрацій 0,8-40 $\mu\text{г/мл}$ та 1-40 $\mu\text{г/мл}$, відповідно.

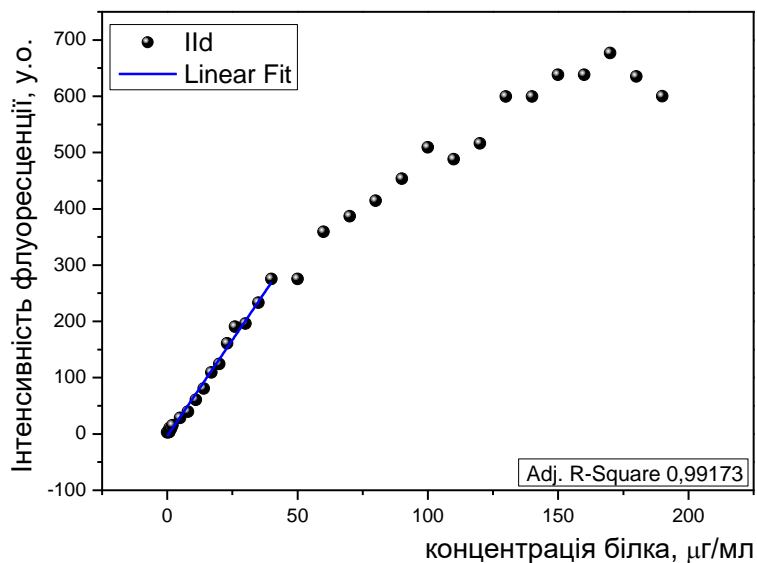


Рис.3.12. Титрування барвника ІІd фібрилами інсуліну. Робочий розчин барвника 2 μМ

3.11 Застосування методу підсилення флуоресценції поверхнею металу для підвищення чутливості триметинових ціанінових барвників

Метод підсилення флуоресценції барвника поверхнею металу можна застосувати для підвищення інтенсивності флуоресцентного відгуку барвників для виявлення низьких концентрацій амілоїдних агрегатів. Раніше було запропоновано триметинові ціанінові барвники як амілоїдчутливі зонди для детекції фібрил інсуліну та лізоциму [117,142]. Для цього дослідження було обрано два триметинові ціанінові барвники – цвиттеріонний барвник D-51 та позитивно заряджений барвник D-151, для яких раніше було показано високу флуоресцентну чутливість при зв'язуванні з амілоїдними фібрилами (структури барвників наведені у Додатку В) [142]. Отриманий шар наночастинок на склі вкривали полівінілпіролідом (PVP).

На отриману поверхню наночастинок, вкритих PVP наносили розчин вільного барвника і барвника у комплексі з фібрилами інсуліну та лізоциму.

Розчин барвника, нанесений на скло, вкрите тільки PVP, використовували як контроль.

Зображення електронної мікроскопії шару наночастинок на склі, вкритому PVP (далі – SIF) та його спектр поглинання наведені на рис. 3.13.

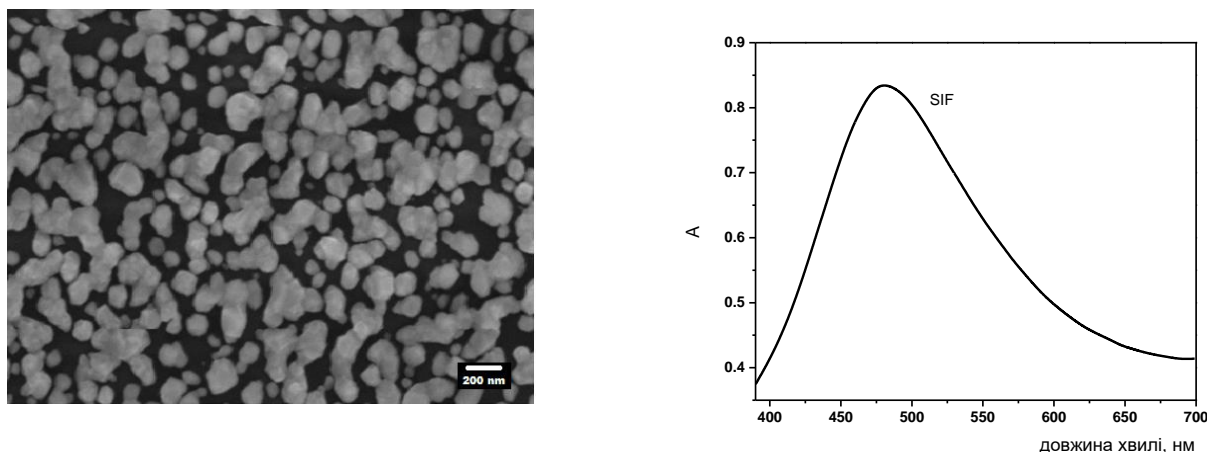
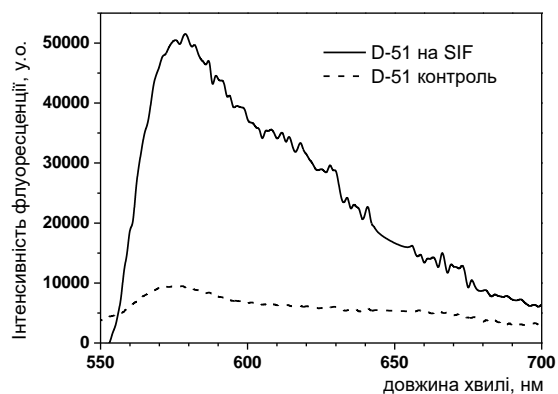


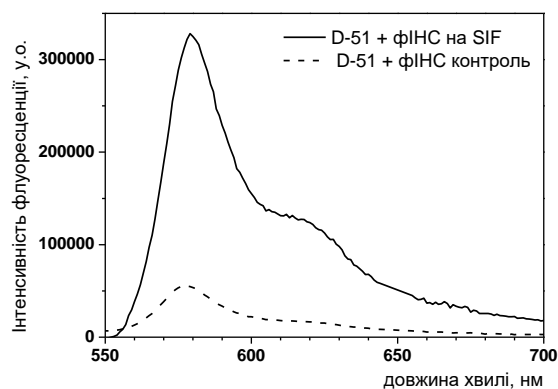
Рис.3.13. Зображення електронної мікроскопії (ліворуч) та спектр поглинання (праворуч) скляної пластини, вкритої SIF

Спектри випромінювання флуоресценції вільного барвника та у комплексі з фібрилами інсуліну та лізоциму, осадженого на SIF та контрольних поверхнях, мають максимуми у діапазон 575-579 нм і форму, характерну для мономерів барвника (рис. 3.14). Це свідчить про те, що осадження барвника та його комплексів з фібрилами не викликає значної агрегації барвника. Інтенсивність флуоресценції осаджених комплексів барвника D-51 з фібрилами інсуліну та лізоциму, в 5,5 і 35 разів вище у порівнянні з відповідними спектрами вільного барвника (табл. 3.10).

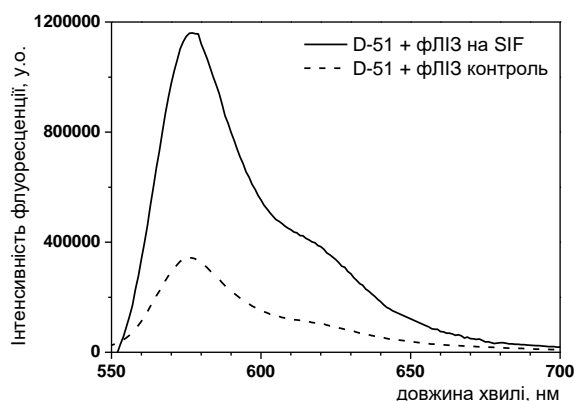
Отже, осадження на поверхні не руйнує комплекс барвник-фібрила. Крім того, кожний із зразків виявляє підвищення інтенсивності при нанесенні на поверхню SIF порівняно з контролем. Спостерігається підвищення в 5.2 рази для вільного барвника, в 6 разів у комплексі з фібрилами інсуліну та 3.4 разів у комплексів з фібрилами лізоциму. Отримані значення посилення флуоресценції металом для ціанінових барвників є близькими до описаних в літературі [143].



a



б



в

Рис. 3.14. Спектри флуоресценції вільного барвника D-51 (а) і в присутності фібрилярного інсуліну (фІНС; б) та лізоциму (фЛІЗ; в) на SIF та контрольній поверхнях. Довжина хвилі збудження 530 нм

З отриманих результатів випливає, що осадження на SIF-поверхні викликає підсилення інтенсивності флуоресценції як вільного барвника D-51, так і його комплексів з амілоїдними фібрилами. Відтворюваність підсилення інтенсивності флуоресценції металом для барвника у комплексі з фібрилами лізоциму набагато краща ніж у комплексі з фібрилами інсуліну. Це можна пояснити або вищою однорідністю морфології фібрил лізоциму, або вищою спорідненістю взаємодії для комплексу барвник-фібрила лізоциму.

Інтенсивність флуоресценції (у.о.) барвника D-51 у вільному стані та у присутності фібрилярного інсуліну (фІНС) та лізоциму (фЛІЗ), осадженого на SIF та контрольних поверхнях

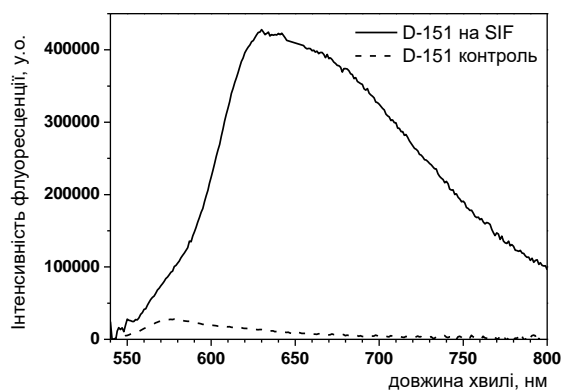
Скляна поверхня	D-51	D-51 + фІНС	D-51 + фЛІЗ
SIF	$(5.2 \pm 1.5) \times 10^4$	$(3.3 \pm 1.8) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^6$
контрольна	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^4$	$(5.5 \pm 2.0) \times 10^4$	$(3.5 \pm 0.5) \times 10^5$

Примітки: SIF – шар наночастинок на склі, вкритому PVP; фІНС – фібрили інсуліну; фЛІЗ – фібрили лізоциму

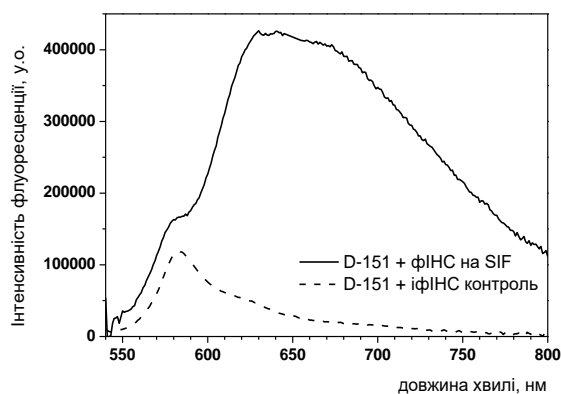
Спектри випромінювання флуоресценції барвника D-151, що містить три позитивно заряджених групи, а також його комплексів з фібрилами інсуліну та лізоциму, осаджених на SIF та контрольну поверхню представлено на рис 3.15. Для барвника, нанесеного на контрольну поверхню, максимум (576-583 нм) та форма спектру флуоресценції відповідають мономерній формі D-151.

При нанесенні на контрольну поверхню, барвник виявляє збільшення інтенсивності флуоресценції в 4,3 та 6,9 рази у присутності фібрил інсуліну та лізоциму у порівнянні з вільним барвником. Отже, молекули D-151 залишаються в комплексі з фібрилами інсуліну та лізоциму при нанесенні на покриту PVP контрольну поверхню в результаті досить сильного зв'язування при утворенні комплексу барвник-фібрила.

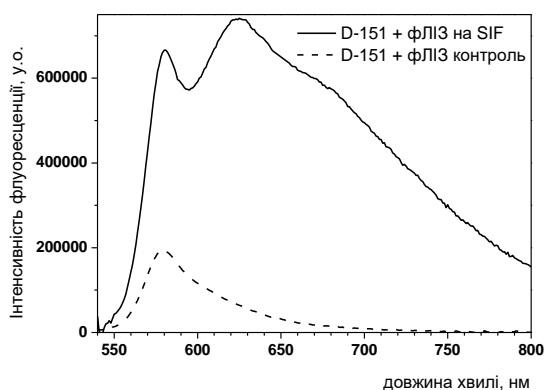
Осадження вільного барвника D-151, а також його комплексів з фібрилами інсуліну та лізоциму, на поверхні SIF призводить до різких змін як форми, так і інтенсивності спектрів флуоресценції (рис. 3.15 б,в). Перш за все, мономерний максимум барвника при 576-583 нм більше не домінує у спектрі.



a



б



в

Рис. 3.15. Спектри флуоресценції вільного барвника D-151 (а) і в присутності фібрил інсуліну (фІНС; б) та лізоциму (фЛІЗ; с) осаджених на SIF та контрольній поверхнях. Довжина хвилі збудження 530 нм

У спектрах флуоресценції вільного барвника та у комплексі з фібрилами інсуліну та лізоциму з'являється інтенсивна широка довгохвильова смуга з максимумом близько 625-640 нм. Подібні широкі смуги у флуоресцентних спектрах ціанінових барвників, зсунуті у довгохвильову спектральну область в порівнянні з мономерною смугою пов'язують з формуванням Н-агрегатів барвників [144]. Наявність Н-агрегатів ціанінового барвника також підтверджується спектрами збудження флуоресценції барвника D-151 у комплексі з фібрилами інсуліну (рис. 3.16). Смуга з максимумом близько 530 нм належить Н-агрегатам барвника, смуга з максимум 569 нм належить барвнику в мономерній формі.

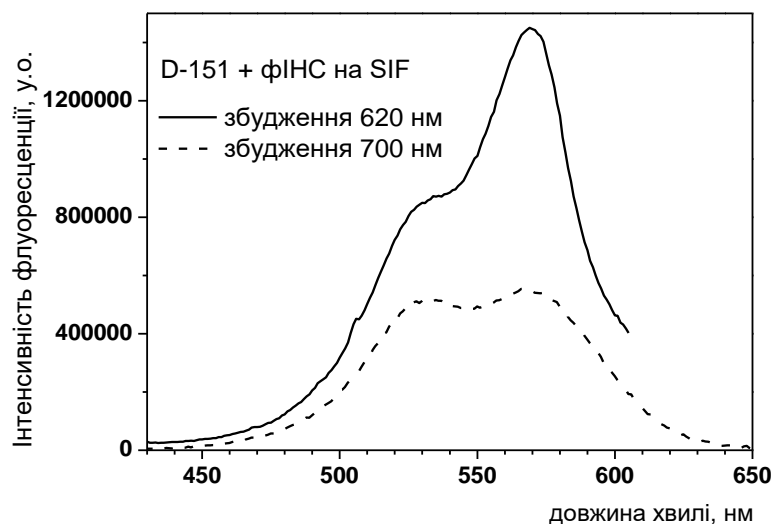


Рис.3.16. Спектри збудження флуоресценції барвника D-151 у присутності фібрилярного інсуліну, осадженого на скло, вкрите SIF-PVP; довжина хвилі випромінювання флуоресценції 620 і 700 нм. Смуга з максимумом приблизно 530 нм належить Н-агрегатам барвника, смуга з максимумом 569 нм належить барвнику в мономерній формі

З отриманих даних випливає, що осадження барвника D-151, що має три позитивно заряджені групи, на поверхню вкриту SIF, викликає агрегацію барвника. У той же час, процеси агрегації цього барвника на контрольній поверхні PVP незначні. Тобто, неможливо правильно оцінити коефіцієнт підсилення флуоресценції поверхнею металу, оскільки співвідношення агрегованого до мономерного барвника в цьому випадку відрізняється на SIF та на контрольній поверхнях. При цьому, Н-агрегати ціанінових барвників мають низьку інтенсивністю флуоресценції [144]. Інтенсивність же флуоресценції агрегатів на поверхні SIF в декілька разів вища, ніж для мономерного барвника (вільного барвника та комплексу барвник-фібрила), осадженого на контрольні поверхні (рис. 3.16). Це свідчить про підсилення інтенсивності флуоресценції на поверхні SIF. Оскільки довгохвильова смуга флуоресценції агрегату має аналогічну форму і інтенсивність для трьох досліджених зразків, можна

припустити, що комплекс барвник-фібрила частково руйнується при осадженні, а агрегати утворюються без участі фібрил.

Оскільки осадження D-151 (вільного і в комплексі з фібрилами) на контрольній поверхні з PVP не викликає подібного ефекту, тож агрегація повинна бути пов'язана з присутністю шару наночастинок, хоча вони і відокремлюються від барвника шаром PVP. Агрегація не спостерігалась для барвника D-51, тому фактором, що сприяє агрегації на контрольній поверхні наночастинок може виступати множинний (+3) позитивний заряд барвника D-151. Можливим поясненням такого впливу є електрична поляризація наночастинок срібла, індукована множинними позитивними зарядами барвника D-151, в результаті чого молекули барвника агрегують. Більше того, негативний заряд поверхні шару срібла захищає позитивні заряди від відштовхування, що сприяє агрегації барвника; подібним чином агрегація заряджених барвників індукується протилежно зарядженою поверхнею або макромолекулами [145]. З наведених міркувань, сильно заряджені барвники можуть мати певні обмеження при застосуванні методу підсилення флуоресценції поверхнею металу (MEF) через електростатичні взаємодії зі сріблом.

Висновки до розділу:

1. Показано суттєву інгібуючу активність серії фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками на різних модельних об'єктах (інсуліні та лізоцимі), який залежить від природи та геометрії позаплощинного ліганду.
1. Фталоціаніни гафнію, що містять аксіально-координовані замісники були вперше досліджені як антифібрилогенні агенти. Підтверджено наявність інгібуючої активності серії фталоціанінів гафнію та цирконію на процес амілоїдної агрегації інсуліну. При цьому найбільш суттєвий ефект на 300 хв спостерігається для фталоціаніну гафнію, що містить піромелітову кислоту ($\approx 96\%$). Для фталоціанінів гафнію їх інгібуюча активність

зменшується у ряду PcHfCl_2 (95%) > PcHfPyr_2 (71%) > PcHfBtfa_2 (68%), для фталоціанінів цирконію – у послідовності PcZrLys_2 (58%) > PcZrDbm_2 (22%), для фталоціанінів гафнію та цирконію з однаковими замісниками PcZrQStr (92%) \approx PcHfQStr (91%) > PcHfDHA_2 (67%) > PcZrDHA_2 (61%). Для планарних фталоціанінів магнію та цинку інгібуюча активність зменшується у ряду PcMg (54%) > PzMg (40%) > PzZn (11%).

2. Центральний атом металу аксіально-координованих фталоціанінів не впливає на інгібуючу активність, оскільки є «закритим», ключову роль відіграє природа позаплощинного ліганду. Центральний атом металу планарних фталоціанінів та порфіразинів магнію та цинку є «відкритим» та впливає на інтенсивність пригнічення фібрилоутворення інсуліну.
3. Підтверджена інгібуюча активність досліджуваних сполук на амілоїдну агрегацію лізоциму, що становить 87% для PcHfQStr та 83% для PcHfCl_2 .
4. З використанням інсуліну як модельного об'єкту була визначена ефективна концентрація інгібіторів IC_{50} , що становить $2,8 \pm 0,6$ μM для PcHfPiromelit , $0,16 \pm 0,08$ μM для PcZrQStr , $0,11 \pm 0,04$ μM для PcHfQStr .
5. Досліджено серію стирилпіридинових барвників, які показали підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності амілоїдних фібрил інсуліну до 23 разів. 4-(4-діалкіламіностирил) піридинові барвники запропоновані як флуоресцентні зонди для детекції амілоїдних фібрил.
6. Показано посилення інтенсивності флуоресценції металом осадженого вільного барвника D-51 та його комплексів з амілоїдними фібрилами на поверхні SIF. Підтверджено можливість застосування методу посилення флуоресценції металом для підвищення чутливості ціанінових барвників при визначенні амілоїдних фібрил у низьких концентраціях.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness / V.B. Kovalska, M.Y. Losytskyy, S.V. Chernii, V.Y. Chernii, I.M. Tretyakova, S.M. Yarmoluk, S.V. Volkov // *Biopolymers and Cell.* – 11/2013. – Vol. 29, Iss. 6. – pp.473-479.
2. Design of 4-(4-dialkylaminostyryl) -pyridinium dyes for fluorescent detection of amyloid fibrils / Inshyn D. I., Chernii S. V., Kovalska V. B., Yarmoluk S. M. // *Biopolymers and Cell.* – 2017. – 32(4):289-299.
3. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyy, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // *Journal of Molecular Recognition.* – 2018. e2660. doi 10.1002/jmr.2660.

РОЗДІЛ 4.

ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ ФІБРИЛОУТВОРЕННЯ

4.1 АСМ дослідження інгібування процесу фібрилоутворення інсуліну та лізоциму.

Методом атомно-силової мікроскопії (АСМ), було порівняно ефект присутності обраних макроциклічних металокомплексів на морфологію агрегатів інсуліну та лізоциму.

За відсутності інгібіторів інсулін формує амілоїдні фібрили 1,5-8 нм в діаметрі з довжиною 1-5 мкм, як лінійні так і розгалужені (рис. 4.1а). Більшість фібрил скручені та формують пучки висотою до 20 нм. Описані в літературі типові амілоїдні фібрили інсуліну мають діаметр 5-12 нм для бичачого інсуліну [146–148], 10-12 нм для інсуліну людини [86] і довжиною до декількох мікрон [86].

4.1.1 Вплив фталоціаніну $PcHfCl_2$ на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.

В присутності $PcHfCl_2$ відбувається формування точкових агрегатів інсуліну та майже повністю пригнічується формування протофіламентів та фібрил (рис 4.1б). Діаметр точкових агрегатів становить 70-100 нм, також присутні сферичні агрегати до 10 нм. Подібні структури можуть бути аморфними агрегатами, враховуючи їх розміри та відсутність флуоресцентної відповіді амілоїдчутливого барвника. Формування подібних агрегатів інсуліну спостерігалось у присутності етанолу [149]. Нерівний край деяких агрегатів, показаних на рис. 4.1б, може свідчити про їх низьку стабільність. Висота

видовжених слідів становить 5 нм, що значно менше, ніж висота самих агрегатів. Подібна морфологія може утворюватися внаслідок часткового руйнування агрегатів, що вказує на їх низьку механічну міцність, характерну для аморфних агрегатів [150].

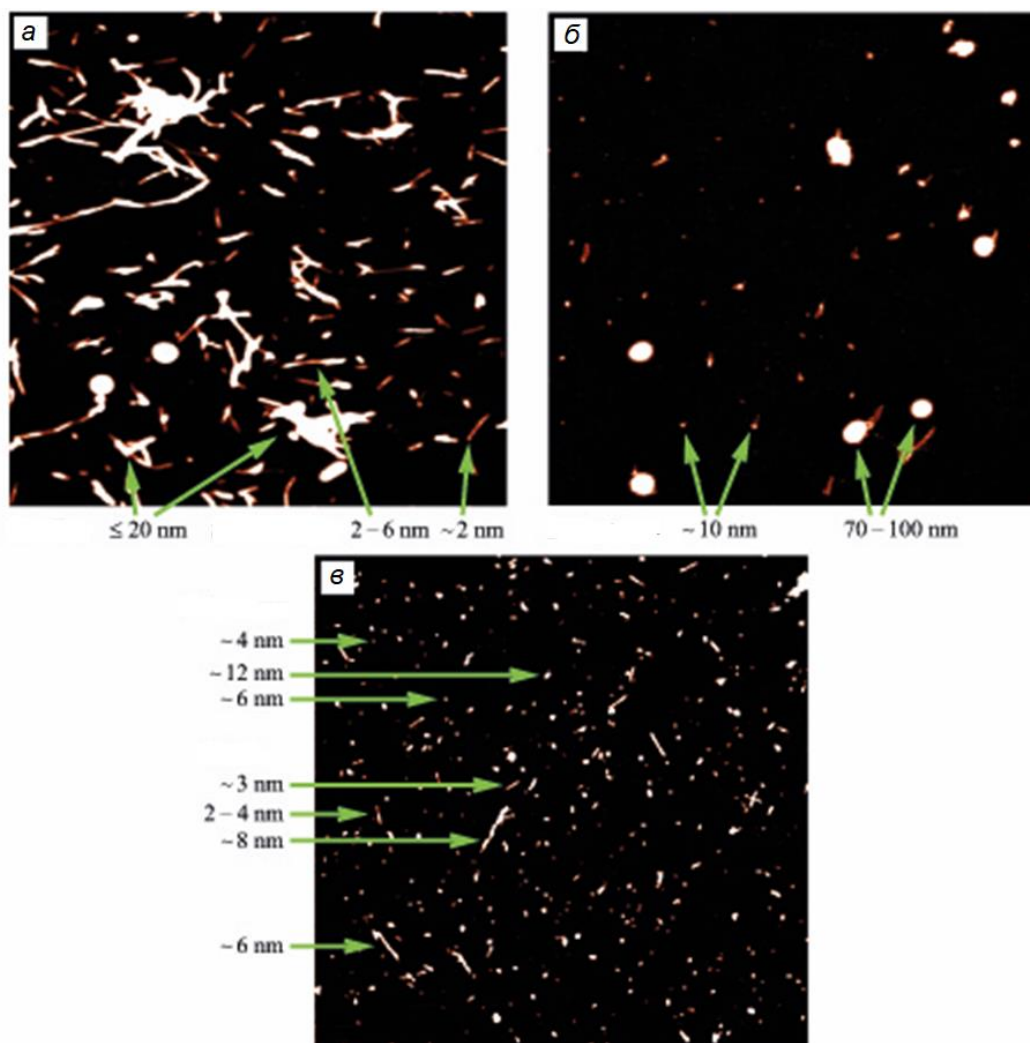


Рис. 4.1. АСМ-зображення агрегатів інсуліну, сформованих за відсутності інгібіторів (а) та у присутності PcHfCl_2 (б), PcZrDbm_2 (в) в кінці реакції фібрилоутворення. Розмір зображення 10×10 μm . Стрілками вказано висоту агрегатів

4.1.2 Вплив фталоціаніну PcZrDbm_2 на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.

У присутності PcZrDbm_2 (рис. 4.1в) спостерігається інтенсивне агрегатоутворення, основним продуктом якого є олігомерні агрегати сферичної

форми діаметром 3-12 нм. Серед продуктів реакції також спостерігається невелика кількість ниткоподібних структур (фібрил) та великих агрегованих кластерів з висотою до 50 нм (дані не представлені). Отже, фталоціанін з об'ємним позаплощинним замісником перенаправляє реакцію фібрилоутворення в бік формування сферичних олігомерних агрегатів. Олігомерні агрегати (індуковані присутністю $PcZrDbm_2$) і великі аморфні агрегати (індуковані присутністю $PcHfCl_2$) мають помітні відмінності в морфології. На це вказує різна інтенсивність флуоресцентної відповіді амілоїдчутливого барвника 7519 при контролі кінетики реакції фібрилоутворення. Барвник 7519 виявляє високий рівень флуоресцентного відгуку у присутності олігомерних агрегатів. При цьому, у присутності аморфних агрегатів флуоресцентний сигнал практично відсутній. Відповідно до літературних даних, олігомери містять β -складчасті структури, з якими зв'язується барвник, тоді як аморфні агрегати є переважно неструктурованими [3].

Можна припустити, що зв'язування фталоціаніну $PcHfCl_2$ відбувається таким чином, щоб перешкоджає утворенню β -складчастої структури та перенаправляє агрегацію білка у бік формування аморфних агрегатів. Малий об'єм позаплощинного замісника фталоціаніну $PcHfCl_2$ не накладає стеричних обмежень на взаємодію, тому фталоціанін може фіксуватися в просторі між двома пептидними ланцюгами. У випадку фталоціаніну з об'ємними лігандами $PcZrDbm_2$ його потенційна взаємодія з білком протягом фібрилоутворення не перешкоджає формуванню β -складчастої структури, але викликає зміну морфології агрегатів (формуються сферичні олігомерні агрегати замість амілоїдних фібрил). Можна припустити, що фталоціанін з об'ємним замісником зв'язується з молекулою інсуліну в місці із меншими стеричними перешкодами для молекули такого розміру. У акісально-координованих фталоціанінів атом металу є «закритим» всередині комплексу, крім того, атоми гафнію та цирконію мають дуже близькі хімічні властивості, тому не впливають на інгібуючу активність.

4.1.3 Вплив фталоціаніну $PcHfDbm_2$ на продукти реакції фібрилоутворення інсуліну на ранніх стадіях.

Для дослідження впливу фталоціаніну на морфологію та структуру продуктів агрегації на ранніх стадіях процесу, ми охарактеризували продукти фібрилоутворення інсуліну, сформовані вільним інсуліном та інсуліном в присутності $PcZrDbm_2$ через 30, 60 та 120 хвилин від початку інкубації методом атомно-силової мікроскопії (рис. 4.2.).

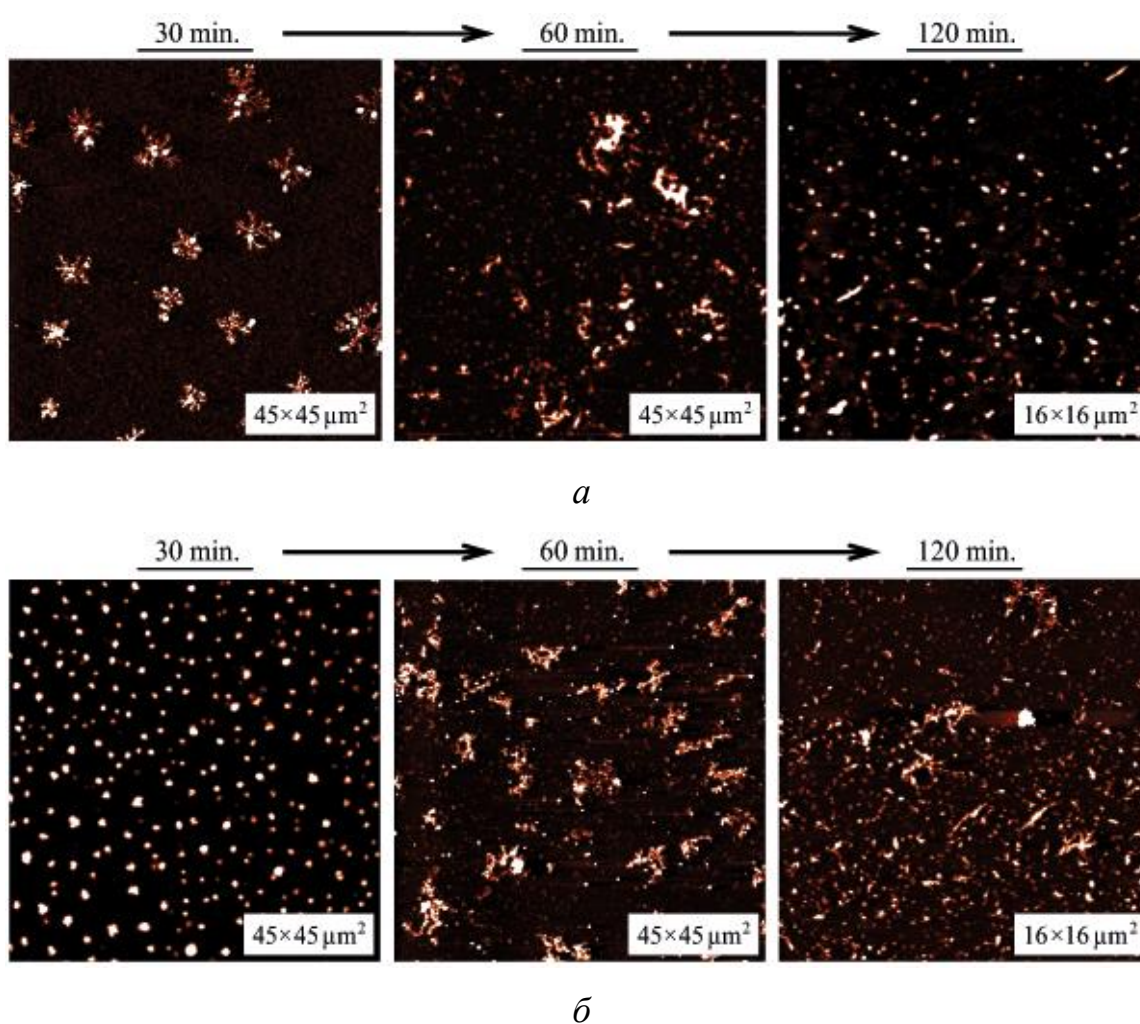


Рис.4.2. Продукти реакції фібрилоутворення інсуліну на ранніх стадіях реакції: а – вільний інсулін, б – інсулін у присутності фталоціаніну $PcZrDbm_2$

Через 30 хвилин у інкубованих сумішах, спостерігається формування великих агрегатів без чіткої форми як за відсутності так і в присутності фталоціаніну $PcZrDbm_2$. Для вільного інсуліну ці агрегати мають діаметр до 150

нм, з дисоціацією до частинок меншого розміру, крім того, спостерігається формування агрегатів з діаметром 2-6 нм, які можуть бути фібрилярними зародками або нуклеусами. У присутності фталоціаніну формуються агрегати висотою 25-200 нм без ознак дисоціації.

Амілоїдчутливий барвник 7519 не дає флуоресцентної відповіді на цій стадії як на вільний інсулін, так і на інтермедіати, сформовані у присутності фталоціаніну (рис. 3.3). Таким чином, ми спостерігаємо на ранніх стадіях великорозмірні нестабільні агрегати, які можна віднести до аморфних, що не містять β -складчастих структур.

Подальша інкубація (загальний час реакції 60 хвилин) призводить до зникнення аморфних структур великого діаметра в обох випадках. Для вільного інсуліну спостерігається збільшення кількості агрегатів діаметром 2-15 нм, а також агрегатів нечіткої форми висотою до 50 нм (рис. 4.2). Ці крупні утворення можуть бути або залишками дезагрегованих аморфних агрегатів або кластерів, утворених латеральною агрегацією олігомерних агрегатів/фібрилярних зародків. У присутності фталоціаніну процес агрегації менш інтенсивний, але має аналогічний характер, як і для вільного інсуліну. Присутність фталоціаніну призводить до утворення точкових і видовжених агрегатів діаметром 2-15 нм, крім того, в інкубованій суміші присутні великі проміжні кластери діаметром до 80 нм.

На цьому етапі реакції показано різке збільшення флуоресценції барвника для обох досліджених зразків, але у випадку вільного інсуліну інтенсивність флуоресценції була на 30% вищою, ніж для інсуліну у присутності фталоціаніну. Можна припустити, що агрегати малих розмірів, які активно формувалися на цій стадії, характеризуються високим вмістом β -складчастих структур.

Ще через годину (загальний інкубаційний період 120 хвилин) для інсуліну спостерігалось розчинення великорозмірних проміжних агрегатів разом із збільшенням кількості агрегатів висотою 5-6 нм, що мають точкову або подовжену форму (рис. 4.2) Серед продуктів реакції присутні сферичні агрегати

висотою 0,7-3 нм та «тонкі» нитчасті агрегати з висотою 0,7-2 нм та довжиною близько 1 мкм (ймовірно, протофіламенти амілоїдних фібрил).

У присутності $PcZrDbm_2$, також збільшується кількість агрегатів інсуліну, серед продуктів присутні сферичні з діаметром 6-25 нм, «товсті» ниткоподібні агрегати висотою 3-20 нм та довжиною <1 мкм, латеральні агрегати з діаметром до 30 нм. На цьому етапі реакції подальше збільшення флуоресцентного відгуку барвника відбувається як для вільного інсуліну, так і для інсуліну у присутності фталоціаніну, що відображає зростання числа β -складчастих структур.

Подальше проходження реакції агрегації у випадку вільного інсуліну головним чином призводить до утворення та подовження амілоїдних фібрил (рис 4.1.). У присутності фталоціаніну відбувається збільшення кількості олігомерних агрегатів, які стають основним продуктом реакції амілоїдної агрегації. В обох випадках інтенсивність флуоресцентного відгуку барвника збільшується на 300 хв у порівнянні з попереднім етапом (120 хв) не суттєво. Це може означати, що більшість ділянок зв'язування барвника утворюються на більш ранніх стадіях реакції агрегації.

4.1.4 Вплив фталоціаніну $PcHfQStr$ на морфологію продуктів фібрилоутворення інсуліну.

Інсулінові фібрили описані в літературі як протофіламенти діаметром 1,2-2,3 нм [72], які потім скручуються у сформовані фібрили діаметром близько 5-10 нм[147].

У присутності фталоціаніну гафнію з хіноліновим стириловим фрагментом ($PcHfQStr$) спостерігається помітне зниження кількості утворених фібрил у порівнянні з контрольною пробою. Протофіламенти з діаметром 0,8-1,2 нм є основним продуктом реакції (рис. 4.3). Варто зазначити, що досліджувана сполука виявляє суттєву інгібуючу активність близько 90% (таблиця 3.5) та низьке значення IC_{50} (0,11 μM). Крім лінійних агрегатів, також у полі зору у незначній кількості присутні сферичні агрегати різного діаметру.

Продукти агрегації інсуліну - переважно згустки фібрил діаметром 2-7 нм та довжиною 0,2-1 мкм (рис. 4.3а). Серед продуктів реакції також присутні сферичні агрегати, які можна віднести до олігомерів. Інсулін містить амілоїдогенні послідовності в обох пептидних ланцюгах; В-ланцюг утворює фібрилярний кор. Вважається, що А-ланцюг з вторинною амілоїдогенною послідовністю знаходиться на зовнішній стороні остову фібрили [68] і таким чином сприяє латеральній агрегації та злипанню фібрил інсуліну (рис. 1.5).

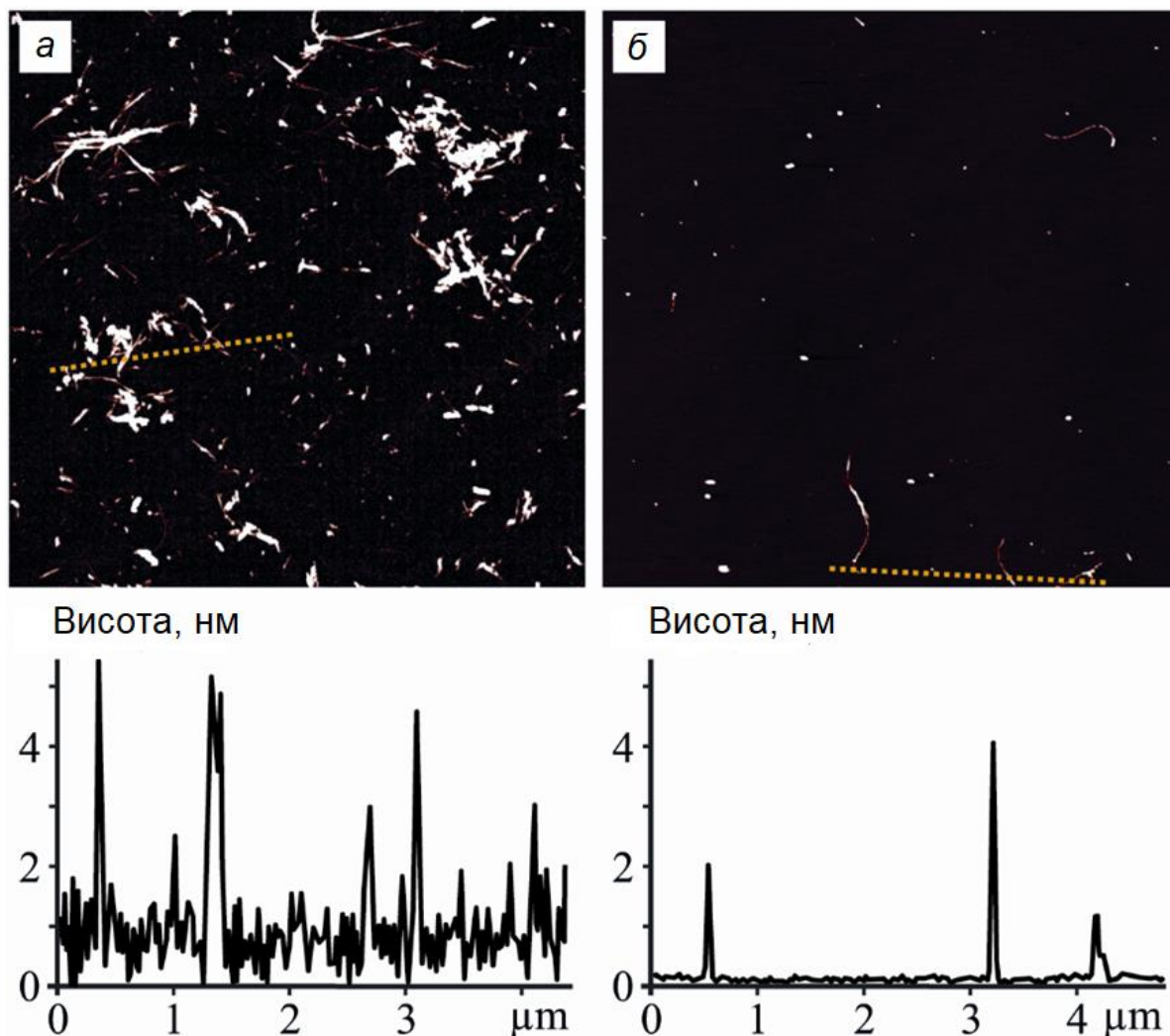


Рис. 4.3. АСМ-зображення та Z-профілі продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну за відсутності (а) та у присутності фталоціаніну PсHfQStr як інгібітору (б), отримані на атомно-гладкій поверхні слюди. Розмір поля 10×10μm

Взаємодія фталоціаніну PcHfQStr з білком призводить до помітного зменшення кількості утворених фібрилярних агрегатів. Виявлено амілоїдні фібрили з діаметром, меншим за сформовані фібрили (1,5-5 нм) та протофіламенти (0,8-1,5 нм). Точкові агрегати з висотою 0,8-10 нм, які спостерігались у випадку вільного інсуліну можуть бути охарактеризовані як олігомерні агрегати або інші проміжні продукти.

Крім того, для інсуліну, агрегованого в присутності PcHfQStr, отримано зображення частково розгорнутої фібрили (рис. 4.4).

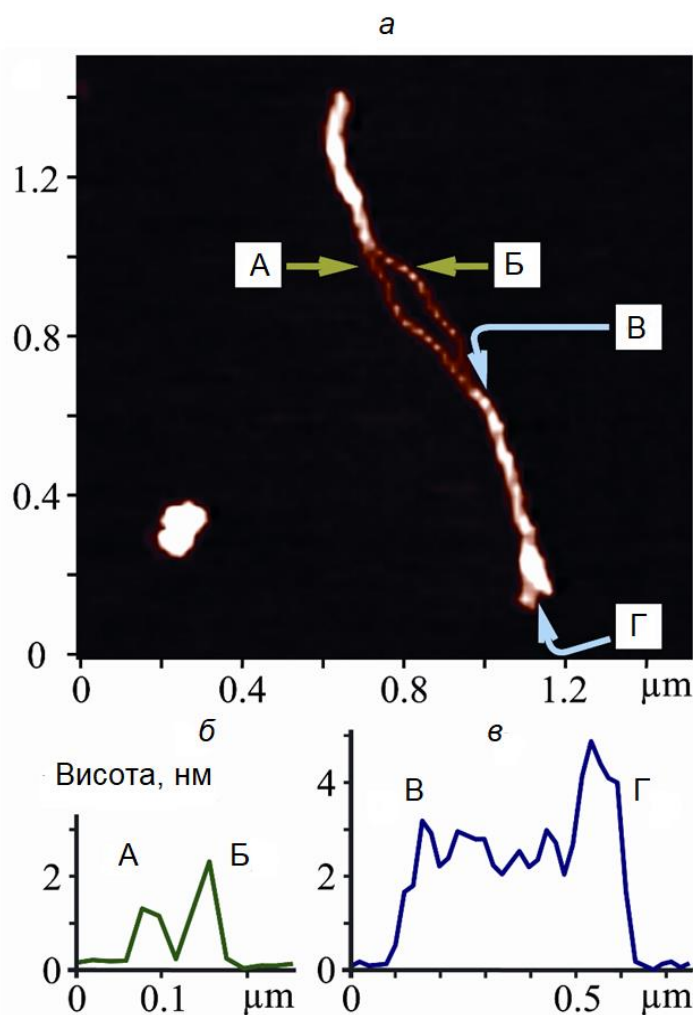


Рис. 4.4. АСМ-зображення частково розгорнутої інсулінової фібрили, утвореної у присутності PcQSt (а). Розміри між точками А-Б та В-Г, позначеними на зображенні, наведені (б, в) на Z-профілях

Це зображення містить два окремих протофіламенти, що свідчить, що сформовані фібрили утворюються з двох (або більше) скручених протофіламентів. Мінімальний діаметр протофіламентів становить $\sim 0,8$ нм, нитки неоднорідні та мають потовщені ділянки діаметром ~ 2 нм (рис. 4.4А,Б).

Слід зазначити, що сформовані фібрили, утворені як вільним інсуліном, так і в присутності фталоціаніну також мають неоднорідну висоту. Відмічено різницю висоти різних частин тієї ж фібрили у декілька нанометрів (рис. 4.4В,Г).

Такі неоднорідності пояснюються прикріпленням ранніх агрегатів білка до фібрилярного остову. Оскільки амілоїдогена послідовність у А-ланцюзі розміщена на зовнішній частині основного фібрилярного остову, вона може служити центром для зв'язування білкових молекул і, таким чином, для утворення бічних агрегатів. Можна припустити, що нековалентне зв'язування фталоціаніну частково знижує інтенсивність цього прилипання і тим самим зменшує діаметр сформованих фібрил у порівнянні з вільним білком або у присутності фталоціаніну.

Наявність фталоціаніну істотно знижує інтенсивність фібрилоутворення інсуліну, що підтверджується даними флуоресцентної спектроскопії. Зміни в морфології інсулінових фібрил, викликані молекулами фталоціаніну полягають в зменшенні діаметру і збільшенні довжини філаментів, крім того, пригнічується латеральна агрегація (таблиця 4.1.).

Таблиця 4.1

Параметри агрегатів, утворених при фібрилоутворенні вільного інсуліну та інсуліну в присутності PcQSt

	Тип агрегату	Діаметр (типовий)	Довжина (типова)
Вільний інсулін	пучки фібрил	Висота 10 – 50 нм	–
	Фібрили	2 – 7 нм	0,2 – 1 μm
PcHfQStr	протофіламенти/фібрили	0.8 – 5 нм	0,4 – 2 μm

Наведені дані дозволяють припустити, що взаємодія гість-господар фталоціаніну з мономерним інсуліном або його агрегаційними проміжними інтермедіатами впливає на реакцію фібрилоутворення наступним чином:

амілоїдні фібрили залишаються продуктом реакції, але їх кількість помітно знижується, а морфологія змінюється.

4.1.5 Вплив фталоціаніну PcHfQStr на морфологію продуктів фібрилоутворення лізоциму.

Було досліджено вплив фталоціаніну PcHfQStr на морфологію продуктів амілоїдної агрегації лізоциму методом атомно-силової мікроскопії. Присутність PcHfQStr помітно змінює характер агрегатів та призводить до формування дуже довгих лінійних структур, що можуть бути ідентифіковані як протофіламенти діаметром 2,0-3,5 нм (рис. 4.5).

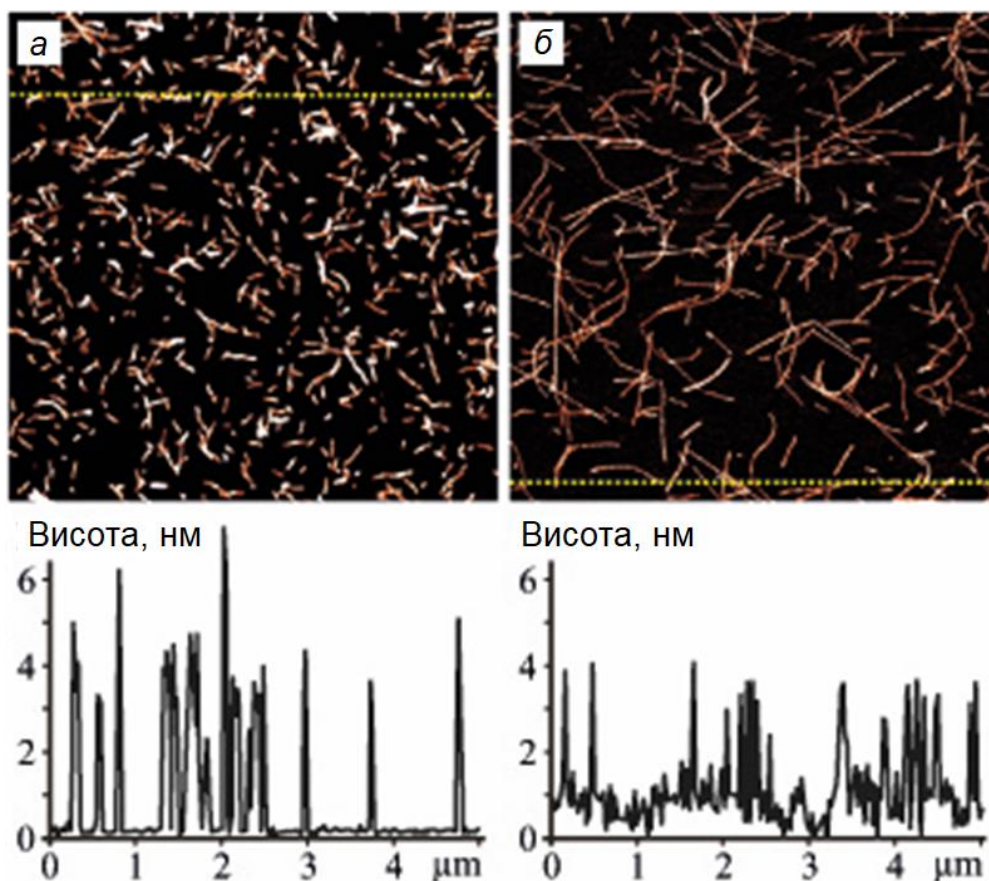


Рис.4.5. АСМ-зображення та Z-профілі продуктів реакції формування амілоїдних агрегатів лізоциму за відсутності (а) та у присутності фталоціаніну PcHfQStr як інгібітору (б), отримані на атомно-гладкій поверхні слюди. Розмір поля 5×5 μm

Лізоцим містить у своїй структурі лише одну амілоїдогенну послідовність, тому як вільний лізоцим, так і лізоцим в присутності фталоціаніну виявляє низьку схильність до латеральної агрегації, згідно літературних даних [75]. Це запобігає утворенню згустків агрегатів, навіть при відносно високих концентраціях білка. З цього випливає, що точки перетину фібрил не пов'язані з їх безпосередньою агрегацією. З наведених міркувань, лізоцим осідає з розчину на субстрат переважно як окремі агрегати. Характеристики морфології агрегатів лізоциму для вільного білка та індукованих присутністю комплексу PcHfQStr представлені в таблиці 4.2. Фібрили лізоциму, що мають діаметр 7-12 нм, і складаються з протофіламентів шириною 2,5-3,5 нм, описані в [151]. Для цього білка також спостерігались довгі фібрилярні агрегати з діаметром ~ 4 нм та довжиною 1-6 мкм [152].

Для вільного білка нами показано формування дендритних амілоїдних агрегатів діаметром 3-7 нм та довжиною 0,1-0,6 μm (рис.4.5а). Висока флуоресцентна відповідь амілоїдчутливого барвника 7519 у присутності цих агрегатів вказує на високий вміст β -складок у їх структурі.

При цьому наявність фталоціаніну значно змінює морфологію продуктів агрегації лізоциму. Зв'язування PcHfQStr з білком індукує утворення більш довгих ниткоподібних агрегатів діаметром 2,0-3,5 нм і довжиною до 2 μm (рис. 4.5б, таблиця 4.2). Деякі фібрили мають у своїй структурі вузли, що збільшують їх діаметр до 5 нм.

Незважаючи на суттєву кількість фібрил, утворених у присутності комплексу, амілоїдчутливий барвник дає низький флуоресцентний відгук протягом реакції фібрилоутворення (таблиця 3.6). Проте додавання PcHfQStr безпосередньо до розчину флуоресцентного барвника з амілоїдними фібрилами суттєво не впливає на інтенсивність флуоресценції барвника у комплексі барвник-фібрила. Тобто, відсутність флуоресцентного відгуку може бути пояснена розміщенням комплексів у остові фібрили протягом росту фібрил, що викликає зміну геометрії борозенки у структурі амілоїдної фібрили (тобто перешкоджає зв'язуванню молекули барвника).

Як випливає з наведеного, агрегати лізоциму, утворені вільним білком, а також при зв'язуванні з фталоціаніном, є більш однорідними порівняно з агрегатами інсуліну. Спостерігається мінімальний діаметр фібрили лізоциму у 1,5 нм, що вказує на те, що фібрила утворена принаймні двома тісно скрученими протофіламентами.

В цілому, ефект інгібітору PcHfQStr на процес амілоїдної агрегації двох структурно різних білків неоднаковий. У випадку лізоциму формуються тонші і значно довщі структури, що показують значно нижчу флуоресцентну відповідь у порівнянні з вільним лізоцимом. Напротивагу цьому, у присутності інгібітору інсулін формує сферичні агрегати та незначну кількість фібрил.

Таблиця 4.2

Параметри агрегатів, утворених при фібрилоутворенні вільного лізоциму та у присутності PcHfQSt

Назва нгібітору	Тип агрегату	Діаметр (типовий)	Довжина (типова)
Вільний інсулін	дендритні агрегати	3,0 – 5 нм	0,1 – 0,6 μм
PcHfQStr	Фібрили	2,0 – 3,5 нм	0,1 – 1,5 μм

Можна зробити висновок, що, при інгібуванні росту фібрил інсуліну різними металокомплексами, природа позаплощинних лігандів є принциповою для формування продукту агрегації певного типу. Реакція агрегації вільного інсуліну призводить до утворення ниткоподібних структур (амілоїдних фібрил) з діаметром 2-6 нм, а також латеральних агрегатів (пучків та згустків) з висотою до 20 нм. У присутності фталоціаніну із позаплощинним замісником малого розміру (PcHfCl₂) основним продуктом реакції агрегації є сферичні агрегати 2-6 нм та великі утворення (діаметром до 100 нм), які можуть бути аморфними агрегатами. У присутності фталоціанінів PcHfQstr спостерігається формування протофіламентів 0,8-1,2 нм та фібрил 1,2-4 нм, відповідно. Сферичні агрегати

невеликого діаметру також присутні у незначній кількості. У присутності $PcZrDbm_2$ спостерігається формування сферичних агрегатів як основного продукту реакції, також присутні поодинокі фібрили.

4.2 СЕМ дослідження морфології продуктів фібрилотворення інсуліну у присутності фталоціанінів та порфіразинів

Досліджено вплив планарних фталоціанінів і порфіразинів магнію та цинку на морфологію амілоїдних агрегатів інсуліну методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) (рис.4.6, 4.7, 4.8).

Вільний інсулін утворює ниткоподібні амілоїдні агрегати довжиною 1,4-2 μm (табл.), часто з розгалуженою структурою (рис.4.6 а,б). Висока щільність фібрил на зображенні може вказувати на високу інтенсивність реакції фібрилоутворення та, як наслідок, латеральної агрегації.

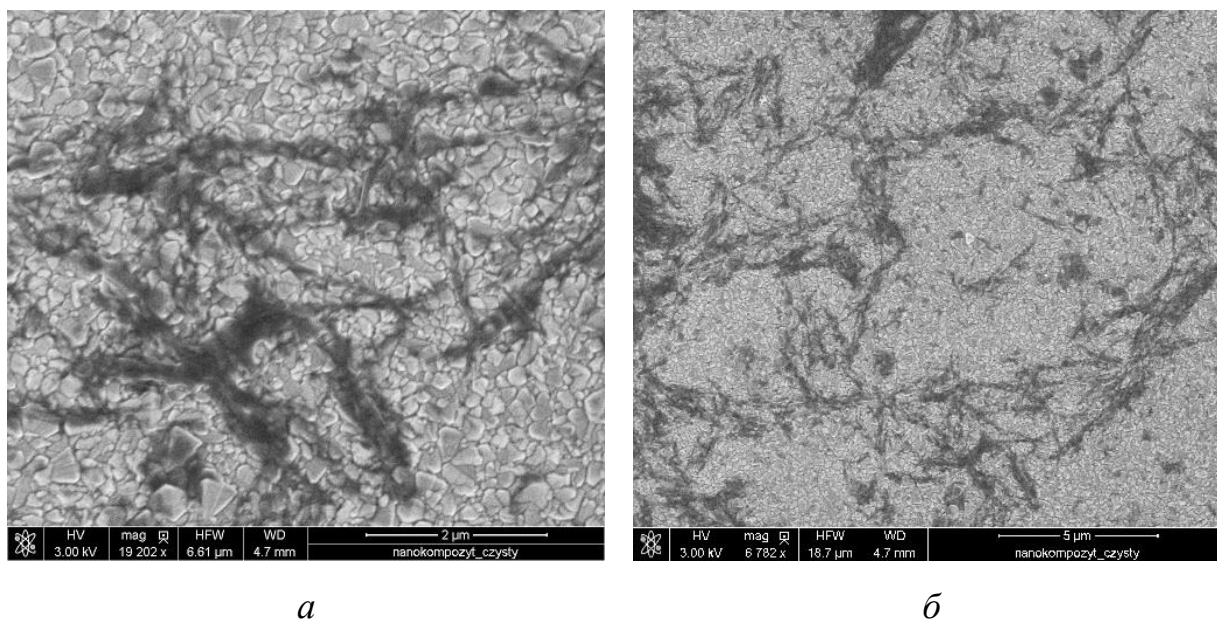


Рис. 4.6. СЕМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення вільного інсуліну, а – шкала 2 μm , б – шкала 5 μm

У присутності макроциклічних сполук фталоціанінів та порфіразинів основним продуктом реакції фібрилоутворення є фібрили, як і для вільного інсуліну. У присутності порфіразину цинку $PzZn$ інсулін формує подовжені

фібрили (рис.4.7 в,г) 0,8-1,6 μm (табл.4.3) сильно розгалуженої структури та з вираженою латеральною агрегацією.

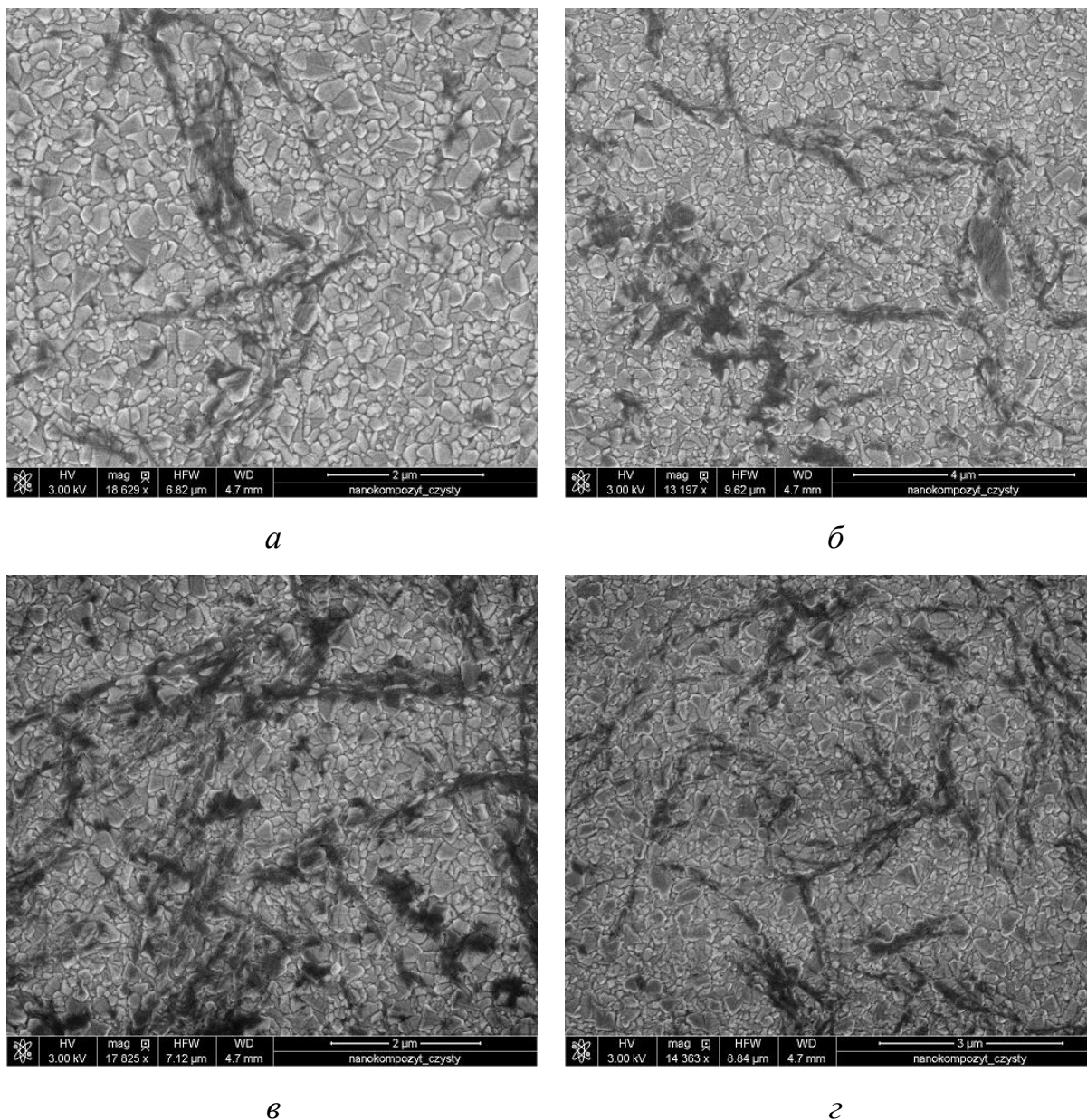


Рис. 4.7. СЕМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну у присутності порфіразинів магнію (а,б) та цинку (в,г), а,в – шкала 2 μm , б – шкала 4 μm , г – шкала 3 μm

У випадку порфіразину магнію PzMg інсулін утворює фібрили довжиною приблизно 0,6-1,3 μm (рис. 4.7 а,б). Для фібрил, індукованих наявністю PzMg, бічна агрегація менш виражена порівняно з вільним інсуліном або PzZn.

Як правило, фібрили інсуліну, отримані в присутності порфіразинів, мають меншу довжину, ніж у вільного інсуліну. Ефект впливу фталоціаніну цинку PcZn призводить до збільшення дисперсії довжини фібрил 0,9-2,7 μm (рис. 4.8в,г) у порівнянні з вільним інсуліном (рис.4.6а,б).

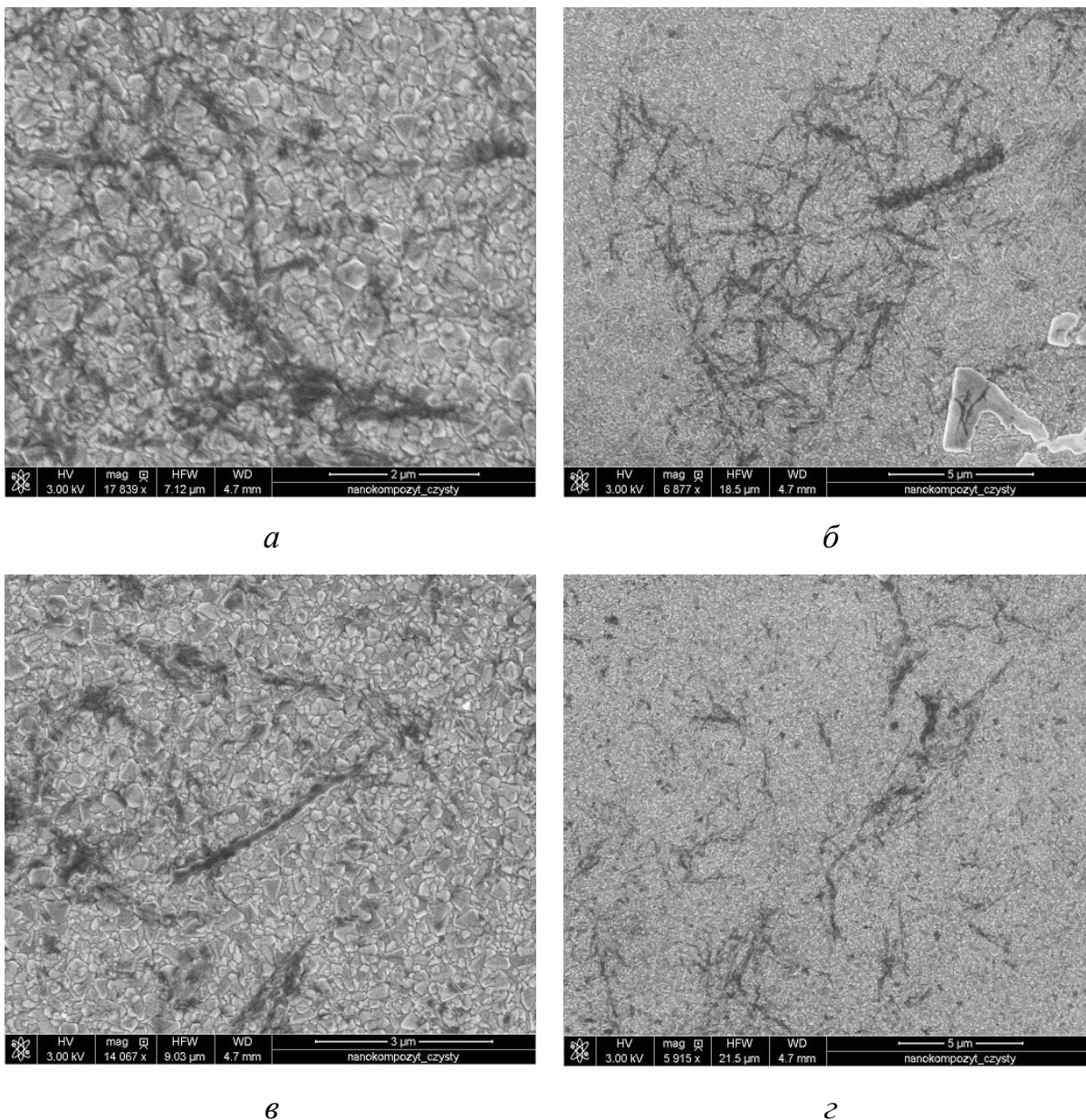


Рис.4.8 СЕМ-зображення продуктів реакції фібрилоутворення інсуліну у приутності фталоціанінів магнію (а,б) та цинку (в,г), а – шкала 2 μm , в – шкала 3 μm , б,г – шкала 5 μm

Суттєва дисперсія довжини фібрил спостерігається у присутності PcMg - становить приблизно 1,2-2,3 μm (рис. 4.8.а,б, табл. 4.3). Крім того,

спостерігається формування великого стержнеподібного агрегату довжиною 4,3 μm (рис.4.8б).

Як правило, у присутності фталоціанінів у порівнянні з вільним білком утворюється більша кількість одиночних довгих фібрил (менша схильність до латеральної агрегації).

Фталоціаніни та порфіразини по-різному впливають на морфологію агрегатів інсуліну, тобто вони індукують утворення фібрил різної середньої довжини, товщини та схильності до агрегації. Це можна пояснити різною геометрією комплексів. Фталоціаніни – це планарні молекули, тоді як порфіразини мають планарний макроцикл з непланарним замісниками на периферії – фенільними фрагментами, що здатні крутитися відносно площини тетрапірольного кільця. Таким чином, стеричні перешкоди, що виникають при супрамолекулярному зв'язуванні фталоціанінів та порфіразинів з поліпептидними ланцюгами, впливають на ріст фібрил та на їх морфологію різними способами.

4.3 Дослідження розмірів продуктів реакції методом динамічного розсіяння світла

Методом динамічного розсіяння (ДРС) світла були отримані гідродинамічні параметри агрегатів, утворених у присутності досліджуваних сполук. Дані, отримані при різних значеннях кута розсіювання, представлені у вигляді залежності Γ/q^2 від q^2 на рис. 4.9. Через внутрішню неоднорідність фібрил у їх суспензії, як правило, відбувається розподіл форм агрегатів, розмірів і, отже, величини гідродинамічного діаметру [153]. Слід зазначити, що фібрилярні структури не є тривіальними для дослідження з використанням методу динамічного розсіювання світла навіть у стаціонарних розчинах [154]. У нашому випадку розчин фібрил різної форми (окремі фібрили, розгалужені фібрили або сформовані кластер фібрил) і розмірів характеризуються оціночним спостережуваним гідродинамічним радіусом на основі наближення до сфери.

Значення спостережуваного гідродинамічного діаметру для фібрил може досягати до декількох μm через їх морфологію [155].

Як зазначено вище, методом СЕМ було показано утворення фібрил як продукту реакції фібрилоутворення в присутності всіх досліджуваних комплексів. Враховуючи це, було порівняно спостережуваний гідродинамічний діаметр фібрил, отриманий методом ДРС (табл.4.3).

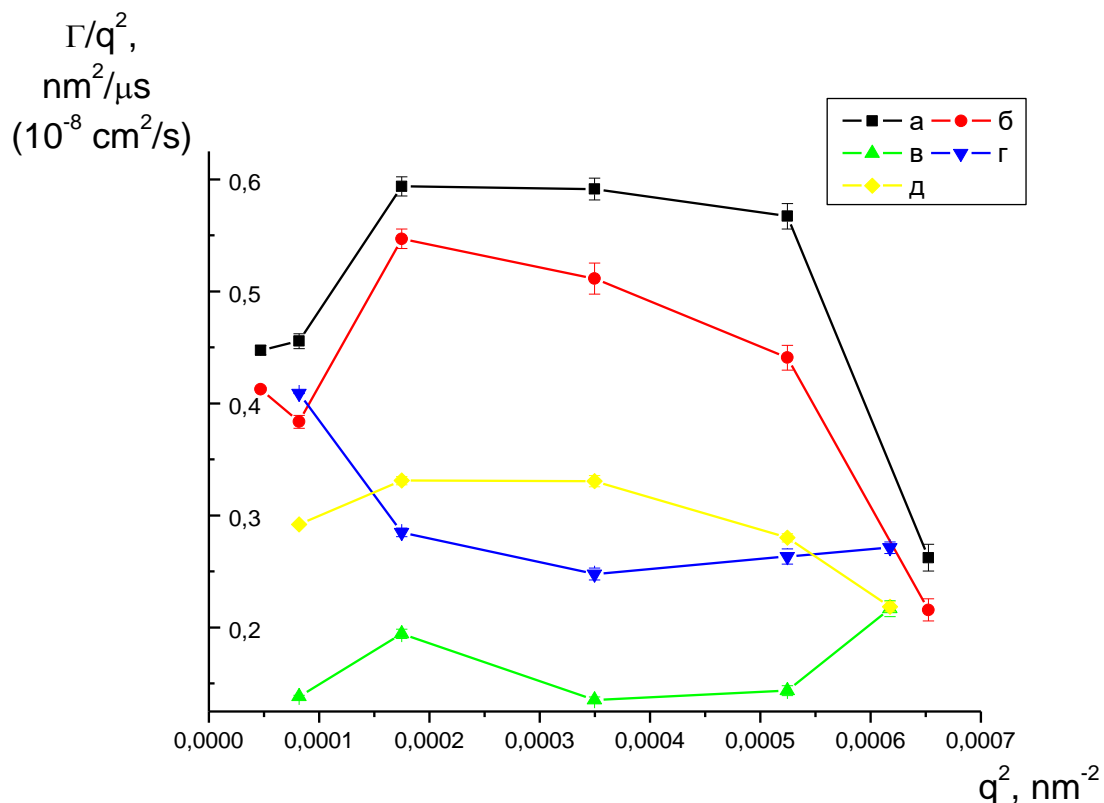


Рисунок 4.9. Визначення розмірів амілоїдних фібрил інсуліну методом динамічного розсіяння світла. Залежність Γ/q^2 від q^2 представлена для 27,2 μM фібрил вільного інсуліну (чорна лінія) та в присутності PzZn (червона лінія), PzZn (зелена лінія), PzMg (синя лінія) та PzMg (жовта лінія) (концентрація інгібіторів 9 μM); а – фібрили інсуліну, б – + PzZn, в – + PzZn, г – + PzMg, д – + PzMg

Гідродинамічні діаметри, оцінені ДРС, загалом співвідносяться з розмірами фібрил, отриманими СЕМ. Цей розрахунок дає найменші значення d

для фібрил вільного інсуліну (близько $1,0 \pm 0,3$ μm) та фібрил, що утворюються у присутності PzZn (приблизно $1,2 \pm 0,3$ μm). Найвище значення гідродинамічного діаметру було отримано у присутності PcZn (середнє значення дорівнює $2,9 \pm 0,7$ μm). Цей результат узгоджується з даними СЕМ: оскільки відомо, що більші агрегати роблять непропорційно більший внесок у інтенсивність ДРС, фібрили з найбільшою верхньою межею розміру за СЕМ (табл. 4.3) також мають найвищий гідродинамічний діаметр. Стосовно фібрил, індукованих присутністю фталоціаніну магнію та порфіразину цинку, то вони показали аналогічні значення гідродинамічного діаметра ($1,7 \pm 0,4$ і $1,7 \pm 0,3$ μm).

Аналіз на основі флуоресцентного барвника показав помітну різницю між ефектом комплексів цинку та магнію (у парі PzMg, PzZn і у парі PcMg, PcZn) на інтенсивність амілоїдної агрегації інсуліну. Проте дані по СЕМ свідчать, що морфологія сформованих фібрил не залежить від природи центрального атома металу.

Таблиця.4.3.

Довжина фібрил інсуліну та спостережуваний гідродинамічний діаметр фібрил, сформованих без інгібіторів та у присутності фталоціанінів та порфіразинів

Зразок	Фібрили вільного інсуліну	в присутності PzZn	в присутності PzMg	в присутності PcZn	в присутності PcMg
L, μm	1,4-2,0	0,8-1,6	0,6-1,3	0,9-2,7	1,2-2,3
d, μm	$1,0 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,4$

Примітки: L – довжина фібрил інсуліну, отриманих із зображень СЕМ; d – спостережуваний гідродинамічний діаметр, розрахований за даними ДРС

Висновки до розділу:

1. Реакція фібрилоутворення інсуліну може бути пригнічена або перенаправлена досліджуваними комплексами. У присутності

фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками різної природи та геометрії формуються продукти різної морфології. В залежності від природи позаплощинного замісника, інсулін формує олігомерні агрегати 2-10 нм ($PcHfCl_2$, $PcZrDbm_2$), аморфні агрегати діаметром до 100 нм ($PcHfCl_2$), протофіламенти близько 0,8 нм у діаметрі ($PcHfQstr$). Присутність $PcHfQStr$ суттєво пригнічує утворення амілоїдних фібрил, зменшує їх діаметр і індукує подовження філаментів, пригнічуючи латеральну агрегацію.

2. Досліджено також вплив фталоціаніну $PcHfQStr$ на амілоїдну агрегацію лізоциму. Присутність фталоціаніну призводило до утворення довгих філаментів до 2,5 μm з діаметром 1,5-3,5 нм. Сформовані у присутності $PcHfQStr$ фібрили помітно відрізнялися від фібрил вільного лізоциму – коротких лінійних агрегатів з діаметрами 3-5 нм і довжиною до 0,6 μm . Формування тонших і довших фібрил лізоциму у присутності фталоціаніну можна пояснити можливим зв'язуванням фталоціаніну із борозенками у структурі амілоїдної фібрили, що ускладнює скручування протофіламентів, але не перешкоджає їх подовженню.
3. Показано, що безпосередньо структура макроциклу також впливає на морфологію утворених амілоїдних фібрил. Так, порфіразини магнію та цинку призводять до утворення коротших фібрил у порівнянні з вільним інсуліном. У присутності споріднених макроциклів - планарних фталоціанінів магнію та цинку спостерігається значна варіабельність довжини сформованих фібрил. Гідродинамічний діаметр популяції фібрил, що оцінюється ДРС, корелює з даними, отриманими СЕМ.
4. Показано, що для аксіально-координованих фталоціанінів інгібуючі властивості в значній мірі залежать від природи та геометрії позаплощинного ліганду. Тоді як для фталоціанінів і порфіразинів, центральний атом металу яких є «відкритим», його природа впливає на інгібуючі властивості металокомплексів. Показано, що безпосередньо

структура макроциклу також впливає на кінетику агрегації білка та морфологію утворених амілоїдних фібрил.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyy, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // *Journal of Molecular Recognition*. – 2018. e2660. doi 10.1002/jmr.2660.
2. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme / Vladyslava Kovalska, Svitlana Chernii, Vsevolod Cherepanov, Mykhaylo Losytskyy, Victor Chernii, Oleg Varzatskii, Anton Naumovets, Sergiy Yarmoluk. // *Journal of Molecular Recognition*. – 2017. 30(8):e2622. doi 10.1002/jmr.2622.
3. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: effect of the out-of-plane ligands / V. Kovalska, V. Cherepanov, S. Chernii, M. Losytskyy, A. Senenko, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 12/2014. – Vol. 22, Iss. 24. – pp.6918-6923. DOI:10.1016/j.bmc.2014.10.024.

РОЗДІЛ 5.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФТАЛОЦІАНІНІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ ТА МЕХАНІЗМУ ІНГІБУВАННЯ

5.1. Вплив агрегаційних властивостей фталоціанінів на їх інгібуючу активність

5.1.1 Агрегація фталоціанінів у водному буфері і ДМСО.

З метою вивчення агрегаційної здатності аксіально-координованих фталоціанінів, було досліджено їх спектри поглинання в полярному розчиннику ДМСО і в 50 мМ TRIS-HCl буфері (рН 7.9) (Додаток Г). У спектрах фталоціанінових комплексів в ДМСО у Q-смузі спостерігались два максимуми - короткохвильовий з максимумом близько 615 нм та високо інтенсивний довгохвильовий пік з максимумами 679-693 нм. Зазначені профілі спектрів характерні для мономерних фталоціанінів. У спектрах поглинання комплексів у буфері діапазони значно ширші, ніж у ДМСО. Вони містять дві смуги, короткохвильову смугу або плече з максимумом в діапазоні 642-646 нм та довгохвильову смугу з максимумом в діапазоні 685- 700 нм. Показано, що для $PcHfBtfa_2$, $PcZrDbm_2$ та $PcHfPyr_2$ довгохвильова смуга найбільш виражена і збільшення концентрації комплексу не призводить до перерозподілу інтенсивностей між смугами поглинання. Така поведінка свідчить про низьку схильність зазначених фталоціанінів до самоасоціації. Для цих комплексів спектри поглинання характеризують їх мономерну форму, а короткохвильова смуга належить вібронному переходу. Інгібуюча активність цих комплексів знаходиться у межах 60-73%.

У спектрах фталоціанінів $PcHfPiromelit$ (рис. 5.1а) та $PcHfCl_2$ (рис. 5.1б) у буфері відносна інтенсивність короткохвильового максимуму збільшується зі

збільшенням концентрації комплексу, а інтенсивність довгохвильового максимуму пропорційно падає. Починаючи з концентрації 5 μM для PcHfPiromelit короткохвильова смуга домінує у спектрі.

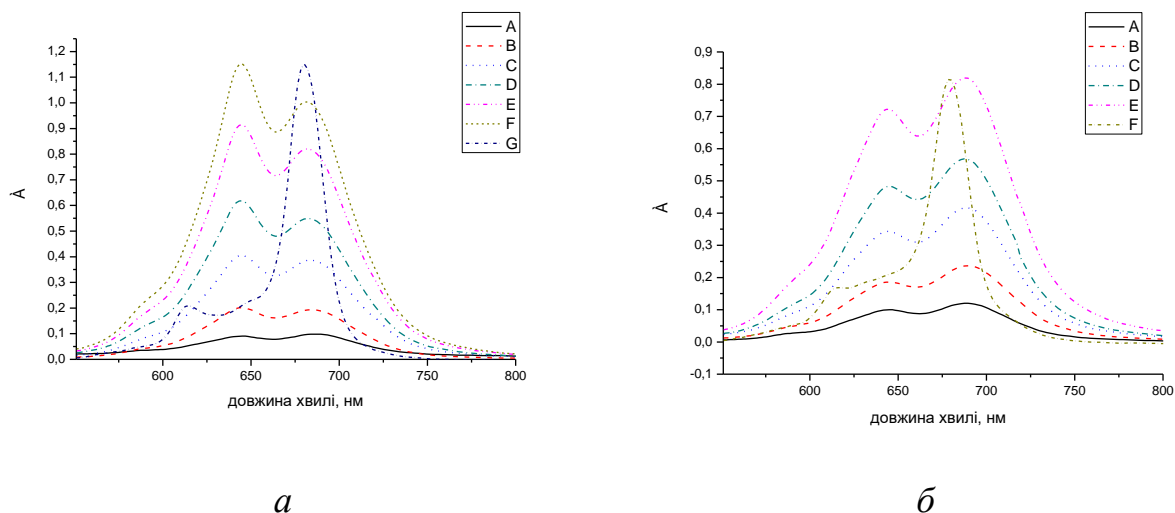


Рис. 5.1. Агрегація фталоціанів PcHfPiromelit (а) та PcHfCl_2 (б) у 50 мМ TRIS-НСl буфері (рН 7.9). А – конц. 10^{-6} ; В – конц. 2×10^{-6} ; С – конц. 5×10^{-6} ; D – конц. 8×10^{-6} ; Е – конц. 10^{-5} ; F – в ДМСО, конц. 5×10^{-6}

Подібна поведінка свідчить про високу схильність PcHfPiromelit та PcHfCl_2 до самоасоціації. У цьому випадку смуга у короткохвильовому діапазоні належить агрегатам фталоціаніну, в той час як довгохвильова смуга відповідає мономерному стану. Як зазначалось раніше, ці два фталоціанінових комплексу виявляють дуже високу інгібуючу активність 96% для PcHfPiromelit та 94% для PcHfCl_2 . Тобто, нами виявлено найвищу інгібуючу активність для фталоціанінів, що мають високу схильність до самоасоціації.

Для інших досліджених комплексів PcHfVtfa_2 , PcHfDbm_2 та PcHfPyr_2 в основному характерні довгохвильові смуги, і збільшення концентрації комплексу не призводить до перерозподілу інтенсивності між смугами поглинання (Додаток Г). Це вказує на низьку схильність цих фталоціанінів до самоасоціації, оскільки у спектрах поглинання цих комплексів у ДМСО двох піків не спостерігається, а профілі спектрів і положення піків відповідають таким для мономерних фталоціанінів.

Комплекси, які виявляють тенденцію до самоасоціації у водному розчині, мають вищу інгібуючу активність.

5.1.2. Агрегація фталоціанінів гафнію в умовах реакції фібрилоутворення.

Оскільки реакція фібрилоутворення відбувається у кислому середовищі – у 0.1 М НСІ, була досліджені агрегаційні властивості фталоціанінів PcHfPiromelit та PcHfCl_2 у відповідних умовах. У спектрах поглинання фталоціанінів у кислому середовищі спостерігається короткохвильовий максимум (близько 650 нм) як менш інтенсивне плече, в той час як довгохвильовий максимум (близько 700 нм) є домінуючою у спектрі. У спектрах поглинання всіх вивчених фталоціанінів у кислому середовищі у короткохвильовому діапазоні спостерігається смуга меншої інтенсивності, ніж смуга у довгохвильовому діапазоні (рис. 5.2).

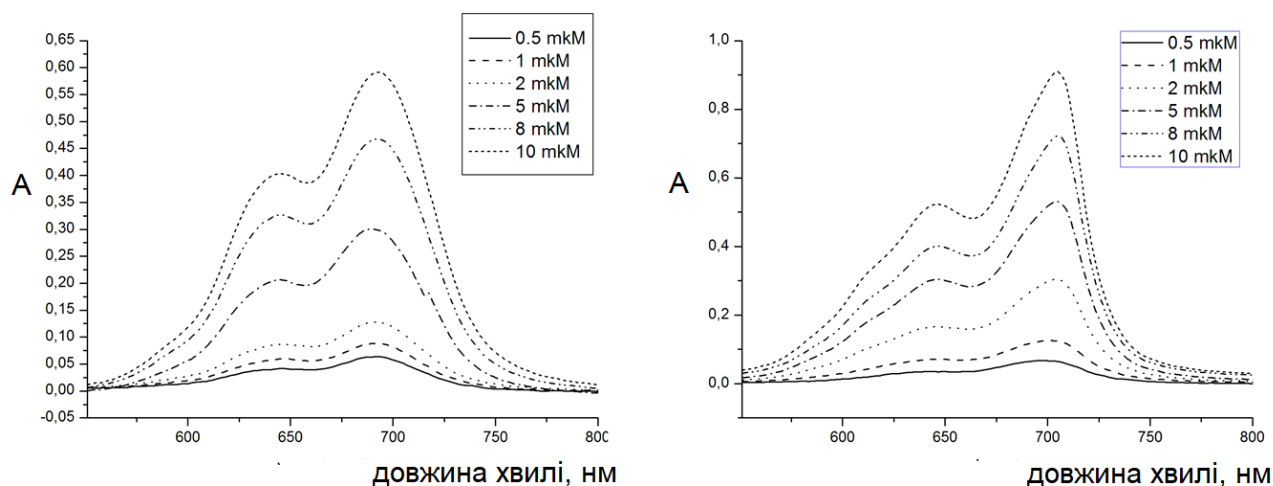


Рис. 5.2. Спектри поглинання PcHfPiromelit (а) і PcHfCl_2 (б) в 0.1 М НСІ. Концентрація діапазоні 0.5-10 μM

Крім того, збільшення концентрації фталоціаніну до 10 μM не призводило до перерозподілу між інтенсивностями коротко- та довгохвильових смуг. Таким чином, ці спектри поглинання фталоціанінів відповідають мономерній формі.

Можна зробити висновок, що незалежно від схильності фталоціанінів до самоасоціації у водному розчині при нейтральному чи слабо лужному рН, ці комплекси не утворюють самоасоціати у кислому середовищі при низькому рН.

5.1.3. Вивчення взаємодії та механізму інгібування інсуліну інгібітором PcHfPiromelit та PcHfCl₂.

Для фталоціаніну PcHfPiromelit, що містить як позаплощинний ліганд піромелітову кислоту і виявляє високу інгібуючу активність та схильність до агрегації, методом спектроскопії електронного поглинання було досліджено взаємодію між металокомплексом і білком у 0,05 М TRIS-HCl буфері (рН 7,9) та 0,1 М HCl (рН 2) (в умовах реакції фібрилоутворення).

У 50 мМ TRIS-HCl буфері (рН 7,9) присутність нативного чи фібрилярного інсуліну у PcHfPiromelit призводить до значного зниження інтенсивності короткохвильового піку, що відповідає агрегатам, і збільшення довгохвильового, що відповідає мономерам (рис. 5.3, А). Таким чином, можна зробити висновок, що фталоціанін взаємодіє як з нативним, так і з фібрилярним білком переважно у мономерній формі. Можна припустити, що на антифібрилогенні властивості досліджуваної сполуки впливає саме її схильність до самоасоціації, агрегати безпосередньо не беруть участі в інгібуванні реакції фібрилоутворення. Оскільки у 0,1 М HCl (рН 2) фталоціанін PcHfPiromelit не агрегує, перерозподіл між піками не спостерігається (рис. 5.3, Б). Таким чином, можна зробити висновок, що самоасоціати фталоціанінів не залучені у механізм інгібування реакції, оскільки фталоціанін зв'язується з білком у мономерній формі шляхом стекінгу до ароматичних амінокислот. Можна припустити, що схильність фталоціанінів до самоасоціації у водному розчині є «індикатором» здатності металокомплексів утворювати стекінг-взаємодії з ароматичними амінокислотами білка, що свідчить про їх антифібрилогенну активність.

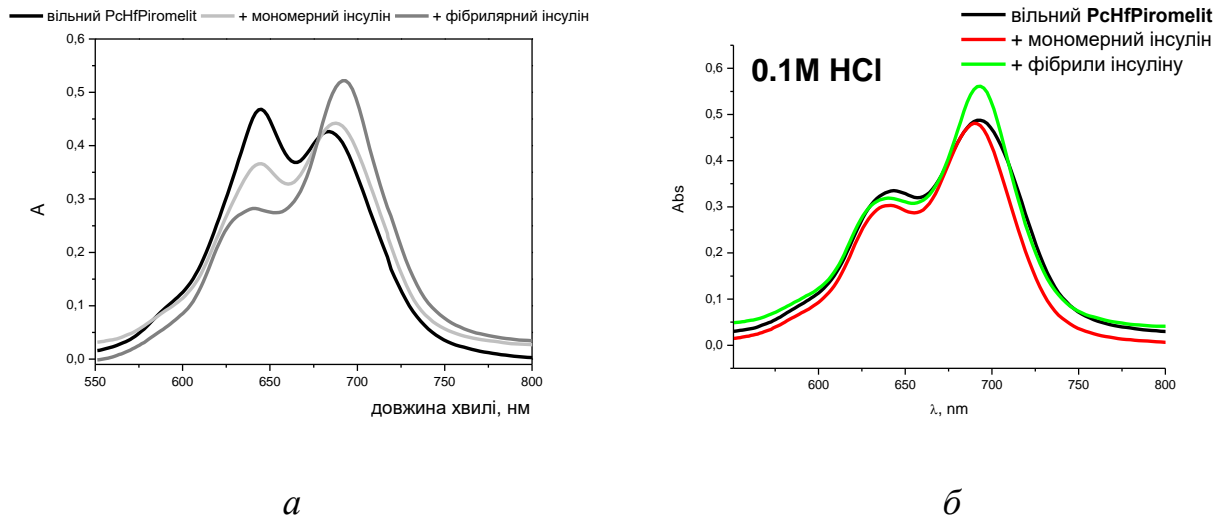


Рис. 5.3. Спектри поглинання PcHfPiromelit (концентрація 10 μM) у присутності нативного і фібрилярного інсуліну (концентрація 34 μM) в буфері (а) і в 0,1 М НСІ (б). А – оптична густина

Було показано, що у кислому середовищі присутність нативного чи фібрилярного інсуліну слабо впливає на співвідношення інтенсивностей короткохвильових і довгохвильових смуг поглинання фталоціанінів з високою інгібуючою активністю (PcHfPiromelit, PcHfCl₂) а отже на ступінь агрегування металокомплексів. З наведених даних ми можемо зробити висновок, що в кислих середовищах металокомплекси існують переважно в мономерній формі, і їх взаємодія з білками не викликає додаткової самоасоціації фталоціанінів або утворення асоціатів на поверхні білка. Аксіальна координація з імідазольним кільцем гістидину вважається механізмом комплексоутворення молекул фталоціаніну тетрасульфонату Zn (II) та білка альфа-синуклеїну [136]. Для досліджених фталоціанінів ми можемо виключити можливість їх хімічного зв'язування з амінокислотами через природу атомів металів та наявність просторових позаплощинних лігандів. Згідно літературних даних, зв'язування фталоціанінів відбувається за запропонованим у літературі для поліфенолів та фталоціанінів механізмом – за рахунок ароматичних взаємодій між ароматичними фрагментами молекул та ароматичними залишками у амліодогенних послідовностях білків. Таким чином, позаплощинний ліганд у

структурі досліджуваних фталоціанінів в залежності від природи забезпечує або додаткову фіксацію фталоціанінів або перешкоджає зв'язуванню. Згідно з літературними даними, здатність циклічних тетрапіролів та фталоціанінів до самоасоціації за рахунок π - π стекінгу розглядається як важливий аспект їх антиамілоїдогенної активності. У різних експериментах було показано, що активність циклічних тетрапіролів залежить саме від їх схильності до самоасоціації та стекінгу – чим нижча була інгібуюча активність, тим нижча схильність до самоасоціації. Фталоціаніни H_2PcS_1 , H_2PcS_2 , та H_2PcS_4 показали високу антипріонну активність *in vitro* та *in vivo*, що свідчить що кількість сульфонатних груп по периферії макроциклу не впливала на інгібуючу активність. Ці дані свідчать, що зв'язування з макроциклом відіграє більшу роль, ніж електростатичні взаємодії між негативнозарядженими сульфогрупами та позитивно зарядженими амінокислотними залишками [28].

Таким чином, додавання фібрилярного інсуліну до комплексів з високою інгібуючою активністю $PcHfP$ іromelit та $PcHfCl_2$ призводить до суттєвого зниження інтенсивності короткохвильового максимуму (що належить агрегатам фталоціаніну) та підвищення інтенсивності довгохвильового максимуму (що належить мономерам фталоціаніну). Можна зробити висновок, що фталоціаніни взаємодіють з нативною і фібрилярною формою інсуліну і ця взаємодія призводить до руйнування самоасоціатів фталоціанінового комплексу. Можна припустити, що зв'язування фталоціаніну з білком відбувається в мономерній формі.

З наведених міркувань, висока схильність до самоасоціації фталоціанінів у водному середовищі вказує на сильну взаємодію між молекулами комплексу та асоціацію фталоціанінів у водному розчині. У присутності білка стекінг-взаємодії фталоціанінових молекул з ароматичними амінокислотами більш бажані ніж самостекінг, що призводить до руйнування фталоціанінових агрегатів та фіксації металокомплексу на поверхні білка. Можна також припустити, що навіть у кислих середовищах, де немає агрегації, все ще відбувається сильний стекінг між комплексами металів та ароматичними амінокислотами, що

призводить до пригнічення фібрилоутворення інсуліну. Водночас, сполуки з нижчою схильністю до стекінгових взаємодій гірше формують самоасоціати чи зв'язуються з ароматичними амінокислотами.

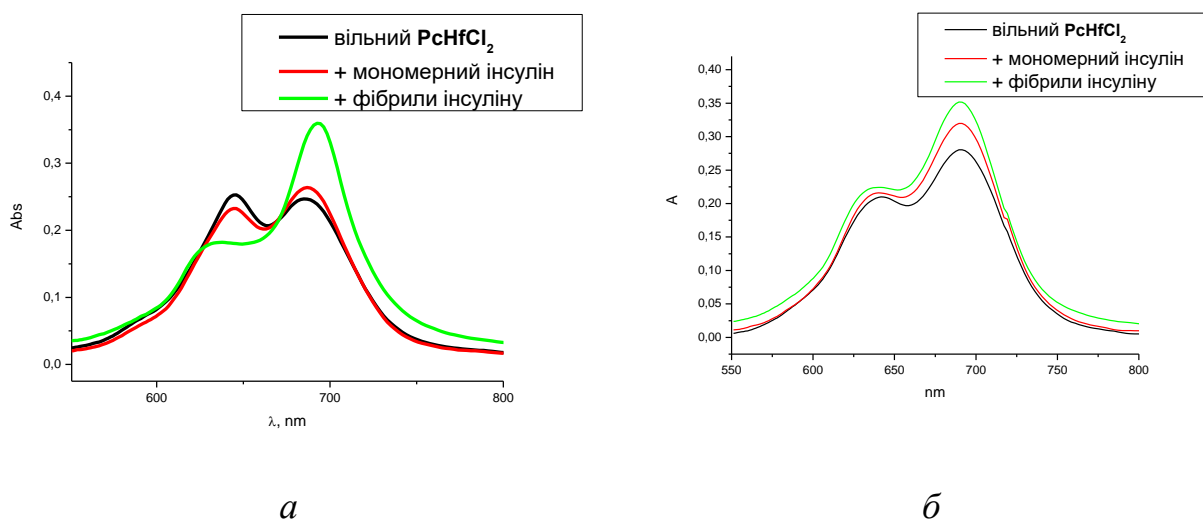


Рис. 5.4. Спектри поглинання PсHfCl₂ (концентрація 10 μM) у присутності нативного і фібрилярного інсуліну (концентрація 34 μM) в буфері (а) і в 0,1 М HCl (б). А – оптична густина

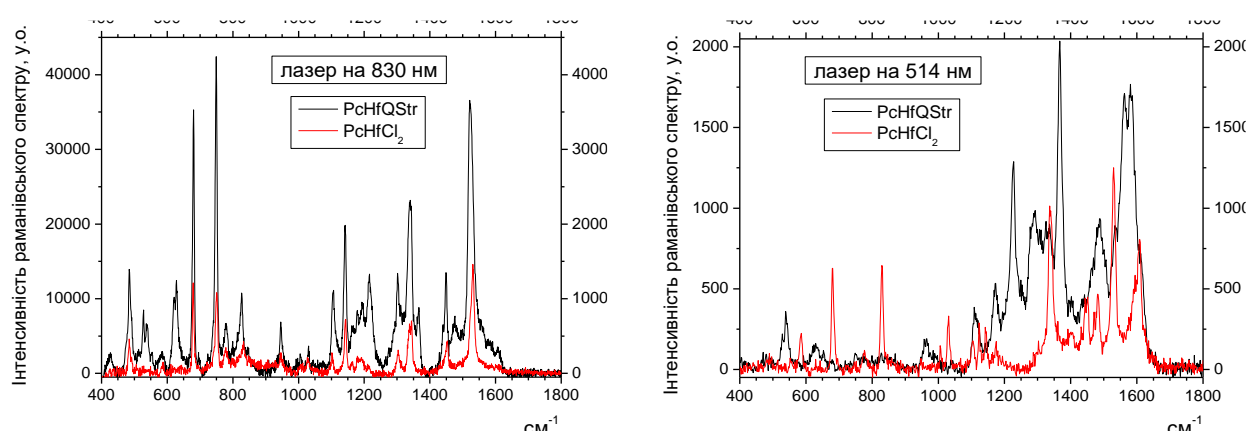
5.2 Поверхнево підсилена раманівська спектроскопія

Поверхнево підсилена раманівська спектроскопія (ППРС) належить до широко використовуваних аналітичних технік, що має ряд переваг [156][157]. ППРС ґрунтується на сильному підсиленні раманівського спектру молекули локальними поверхневими плазмонами - осілаціями вільних електронів, індукованими довжиною світла збудження на металевій поверхні, наприклад, на наночастинках колоїдних металів [158].

Поверхнево підсилені раманівські спектри можна отримати для усіх молекулярних систем, але це не означає, що всі молекули є хорошими зондами. Є три основні чинники, що впливають на активність молекулярної системи. Перший з них – це електромагнітне поле, створюване плазмонними наноструктурами. Другим є внутрішні комбінаційні властивості молекул (поперечний переріз). Загалом, малі молекули без збагачених електронами

атомів мають невеликий комбінаційний перетин. Поперечний перетин збільшується з розміром молекули, а значить, з наявністю розширених π - π систем та багатих на електрони атомів, що робить його більш поляризованим [159]. Третій чинник – це спорідненість молекули до плазмонної поверхні (адсорбент-адсорбатні взаємодії). Молекули фталоціаніну мають досить великий розмір і, таким чином, потенціал для техніки ППРС. Три похідні фталоціаніну, зарекомендували себе як зонди для кількісного визначення олігонуклеотидів. Досліджувані фталоціаніни містили різні центральні атоми металу - алюміній, цинк і кобальт, і різні бічні замісники - $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$, SCH_2COOH та COOH [160].

Нами було досліджено ППРС на наночастинках Ag для характеристики взаємодії між молекулою фталоціаніну PcHfCl_2 та амілоїдними фібрилами інсуліну. В першу чергу було досліджено раманівські спектри кристалів фталоціанінів PcHfQstr та PcHfCl_2 (рис. 5.5).



а

б

Рис. 5.5. Раманівські спектри об'ємних кристалів фталоціанінів гафнію PcHfQstr (чорний) та PcHfCl_2 (червоний) при збудженні на 830 нм (ліворуч) та 514 нм (праворуч)

Слід зазначити, що отримані спектри PcHfQstr та PcHfCl_2 не підсилені металом та за відсутності білка відрізняються залежно від довжини хвилі збудження, позаплощинного ліганду у молекулі фталоціаніну (стириловий

фрагмент у PcHfQStr або Cl_2 у PcHfCl_2) та від способу підготовки зразка (об'ємний кристал або висушений розчин). При цьому, у всіх або декількох спектрах спостерігалися однакові смуги, які можна віднести до характерних для вібрації фталоціанінової молекули [161].

Смуги при 485 cm^{-1} і 585 cm^{-1} , ймовірно, пов'язані з деформаціями ізоіндольного кільця (рис. 5.6). Дихальна вібрація (breathing vibration) 16-членного внутрішнього кільця спостерігається на майже 682 cm^{-1} . Смуги при 749 cm^{-1} можуть бути пов'язані з антисиметричною деформацією макроциклу. В той же час, смуги поблизу 778 cm^{-1} і 825 cm^{-1} , як вважається, пов'язані з розтягуванням C-N аза-груп макроциклу.

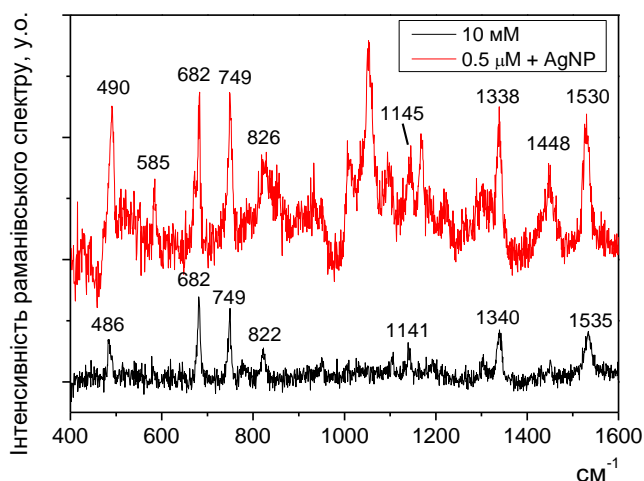


Рис.5.6. Поверхнево підсилений (верхній, висушений 5×10^{-7} М розчин у буфері в присутності AgNP) та не підсилений (нижній, висушений 10^{-2} М розчин ДМФА) раманівський спектр фталоціаніну гафнію дихлориду (PcHfCl_2), збудження на 830 нм

Зворотні коливання ізоіндольних груп C-H спостерігаються поблизу 1037 cm^{-1} та 1105 cm^{-1} . Діапазони, близькі до 1140 cm^{-1} і 945 cm^{-1} , могли належати до дихальної вібрації групи пірролу та бензолу, відповідно. Інтенсивний раманівський пік при 1342 cm^{-1} належить вібрації розтягу $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ піррольної групи. Пік циркуляції вібрацій C-N спостерігався біля 1450 cm^{-1} .

Одна з найбільш інтенсивних смуг у раманівському спектрі фталоціаніну спостерігалася при 1528 см^{-1} , що відповідає симетричній вібрації розтягу зв'язку C β -C β у піррольній групі. Сильні смуги, що спостерігаються для сухого зразка PcHfQStr при збудженні на 514 нм (тобто при 1173 см^{-1} , 1226 см^{-1} , 1367 см^{-1} , 1484 см^{-1} і 1558 см^{-1}), можливо пов'язані з вібраціями стирилового ліганду.

Раманівський спектр PcHfCl₂ представлений для порівняння з поверхнево підсиленним спектром PcHfCl₂ на Рис. 5.5. Як видно, обидва мають аналогічну спектральну картину з кількома додатковими смугами ППРС, які не були чітко виділені в основному спектрі (наприклад, на 585 см^{-1} і 1448 см^{-1} , що, можливо, пояснюється деформаціями іоіндолового кільця та вібраціями розтягу C-N [161] відповідно).

Абсолютна величина інтенсивності раманівського розсіяння для $0,5\text{ }\mu\text{M}$ PcHfCl₂ у присутності AgNP має такий же порядок, як абсолютна величина інтенсивності раманівського розсіяння для 10 mM фталоціаніну без підсилення наночастинками металу (рис. 5.6), що вказує на суттєве підсилення ППРС. Значення коефіцієнта підсилення оцінювалось для кількох смуг PcHfCl₂ з використанням спектрів $0,5\text{ }\mu\text{M}$ PcHfCl₂ у присутності AgNP та 10 mM того ж фталоціаніну без підсилення наночастинками металу (рис 5.5); результати показують значення порядку 10^4 - 10^5 (табл. 5.1).

Таблиця.5.1

Оцінені значення аналітичного коефіцієнта підсилення для фталоціаніну PcHfCl₂ для декількох смуг при збудженні при 830 нм.

Довжина хвилі, см^{-1}	682	749	1340	1529
Коефіцієнт підсилення	$4,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$

Крім того, було вивчено можливість одержання ППРС-спектрів фталоціаніну PcHfCl₂ при взаємодії з мономерним та фібрилярним інсуліном (рис. 5.7). Додавання мономеру інсуліну призводить до появи широких смуг у спектрі фталоціаніну ППРС при 1310 см^{-1} і 1572 см^{-1} при збудженні на 514 нм,

в той же час як інші смуги фталоціаніну зникають, а у випадку збудження на 830 нм – гасіння характерних фталоціанінових смуг навіть більш виражене.

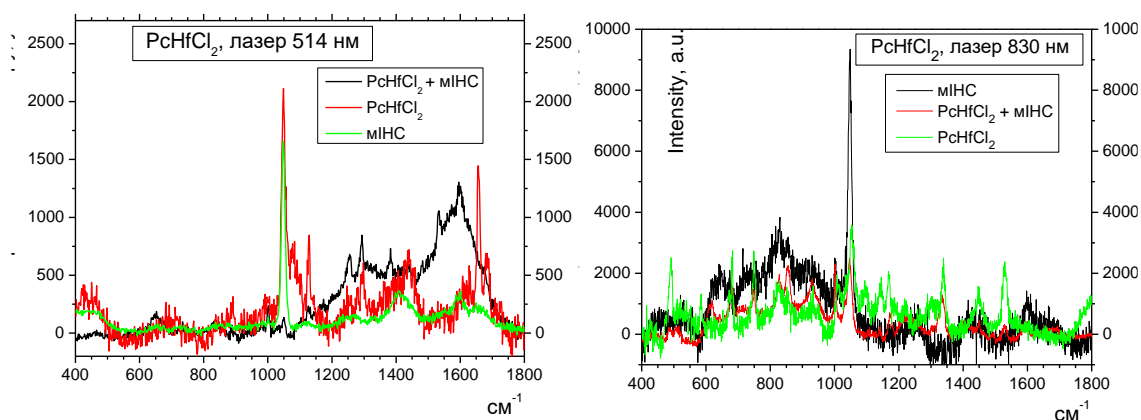


Рис.5.7. Поверхнево-підсилені раманівські спектри фталоціаніну гафнію з атомами хлору (PcHfCl_2), мономерного інсуліну (mINS) і для фталоціаніну з мономерним інсуліном ($\text{PcHfCl}_2 + \text{mINS}$). Збудження при 514 нм (ліворуч) і 830 нм (праворуч)

Було досліджено зміну інтенсивності спектрів фталоціаніну PcHfCl_2 у присутності фібрилярного інсуліну. На Рис. 5.8 представлені спектри PcHfCl_2 ($0,5 \mu\text{M}$), підсилені AgNP, в присутності різних концентрацій фібрилярного інсуліну ($0,425 \mu\text{M}$, $0,142 \mu\text{M}$ та $0,0425 \mu\text{M}$).

Спектри ППРС для PcHfCl_2 у присутності різних концентрацій фібрилярного інсуліну містять інтенсивні смуги, що відповідають вібраціям фталоціаніну (рис. 5.8). Ці спектри, як правило, в кілька разів інтенсивніші порівняно з вільним PcHfCl_2 . Найбільш інтенсивний сигнал ППРС спостерігався у випадку концентрації фібрилярного інсуліну в $0,142 \mu\text{M}$, тоді як для вищої та нижчої концентрації інсуліну інтенсивність ППРС приблизно в два рази менша.

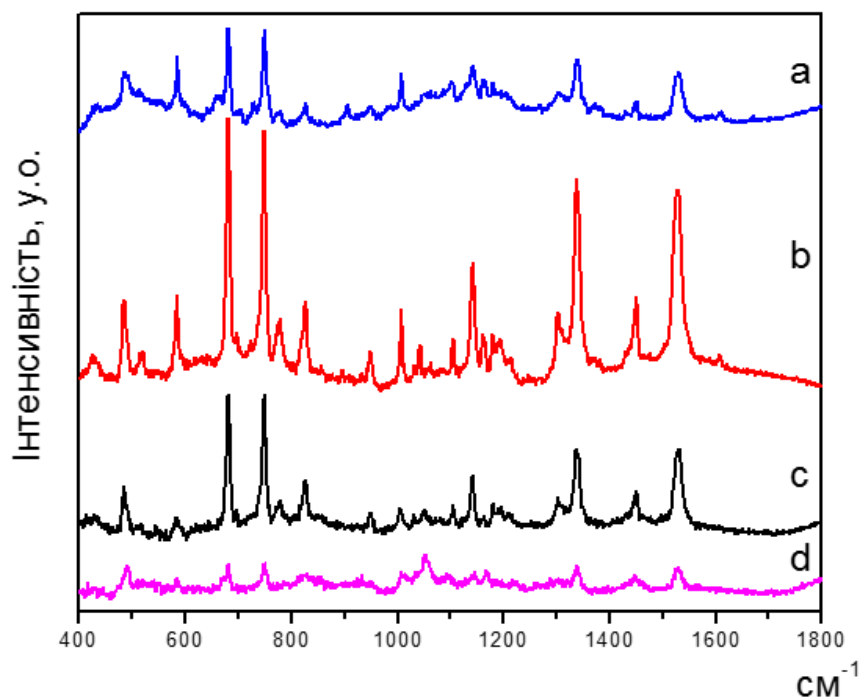


Рис.5.8 Поверхнево підсилені раманівські спектри PcHfCl_2 ($0,5 \mu\text{M}$) у присутності фібрил інсуліну у концентраціях $0,425 \mu\text{M}$ (а), $0,142 \mu\text{M}$ (б), $0,0425 \mu\text{M}$ (в) та без фібрил інсуліну (г). Довжина хвилі збудження 830 nm

Додавання фібрилярного інсуліну впливає на ППРС фталоціанінів за різноспрямованими механізмами, деякі з них приводять до збільшення ППРС, а інші - пригнічують його. Тобто, збільшення інтенсивності може бути обумовлено зміною статусу агрегації AgNP, оскільки фібрилярний інсулін взаємодіє з AgNP змінюючи поверхневі властивості AgNP. Падіння підсилення раманівського розсіяння на AgNP у присутності амілоїдних структур дозволяє припустити, що амілоїдні фібрили можуть утворювати проміжки між агрегатами AgNP до нанометрів, що називають «гарячими плямами» [162]. Крім того, подібне підсилення інтенсивності смуг може бути пояснено зв'язуванням більшого числа молекул фталоціаніну з AgNP після висушування у випадку його комплексу з фібрилою у порівнянні з вільним фталоціаніном. У той же час, оскільки концентрація білка збільшується, більше білкових молекул покриває поверхню AgNP, що може спричинити пригнічення поверхневих плазмонів і зменшити активність AgNP та їх агрегатів. Іншим фактором, що сприяє наявності більш

високого сигналу ППРС при зниженні концентрації білка, може бути переважне зв'язуванням фталоціаніну з фібрилою та збільшення середньої відстані між фталоціаніном і металом. Подібне було показано для комплексу Кумасі Блакитного з кількома глобулярними білками [163].

Таким чином, може бути два пояснення залежності ППРС від концентрації фібрилярного інсуліну. Першим поясненням можуть виступати змінені фактори взаємодії між молекулами фталоціаніну та білка з підвищенням концентрації білка – а саме зменшення поверхневого плазмону та збільшення числа білкових молекул на поверхні AgNP та зміна статусу агрегації AgNP. Другим поясненням можуть бути особливості супрамолекулярної асоціації фталоціаніну з фібрилярним інсуліном. Вважається, що молекула фталоціаніну зв'язується з фібрилою шляхом укладання планарного макроциклу з ароматичними амінокислотними залишками білка. Спостережувана стехіометрія може бути пов'язана з рядом ароматичних амінокислот, доступних для зв'язування фталоціаніну. Крім того, інтенсивність $PcHfCl_2$ у ППРС у присутності фібрилярного інсуліну, несуттєво, але залежить від порядку підготовки зразка (спочатку інкубація фталоціаніну на наночастинках та подальше додавання амілоїдних фібрил або навпаки). Це може вказувати на слабку спорідненість фталоціаніну до поверхні AgNP та високу афінність молекул фталоціаніну до сформованих фібрил. Слід зазначити, що не було помічено суттєвого зсуву отриманих смуг відносно спектру ППРС вільного $PcHfCl_2$. Це говорить про те, що молекули фталоціаніну не піддаються хімічному обмеженню при взаємодії з фібрилою.

5.3 Механізм інгібування досліджуваних комплексів

Специфічні сегменти в структурі білків – амілоїдогенні послідовності, мають вирішальне значення для індукції утворення амілоїдних агрегатів. У структурі інсуліну людини це послідовність (11)LVEALYL(17) або її версії (11)LVEALY(16) і (12)VEALYL(17), розташована у В-ланцюзі. Крім того, також

є вторинна амілоїдогенна послідовність інсуліну (13)LYQLEN(18), розташована в А-ланцюзі. Ця послідовність може бути або залучена у формування структури фібрили, або залишатися за межами остову фібрили і, таким чином, створювати умови для латеральної агрегації та «злипання». На механізм взаємодії та інгібуючу активність досліджуваних сполук впливає багато факторів, таких як тип центрального металу, природа та геометрія позаплощинного ліганду. Можна припустити, що фталоціанін з замісником малого розміру $PcHfCl_2$ зв'язується з амінокислотами у амілоїдогенних послідовностях та перешкоджає утворенню β -складчастої структури, перенаправляючи агрегацію білка у бік формування аморфних агрегатів. Така взаємодія може відбуватися за рахунок стекінгу між ароматичною системою молекули фталоціаніну та залишками тирозину в амілоїдогенних послідовностях В- і А-ланцюгів. Малий об'єм аксіального замісника не перешкоджає фіксації фталоціаніну у просторі між двома пептидними ланцюгами. У випадку $PcZrDbm_2$ з об'ємним лігандом взаємодія з білком не перешкоджає формуванню β -складчастої структури, але перенаправляє процес фібрилоутворення, змінюючи структуру агрегатів (утворення сферичних олігомерних агрегатів замість амілоїдних фібрил). Можна припустити, що фталоціанін з об'ємним замісником зв'язується з молекулою інсуліну в місці, що має менші стеричні перешкоди для молекули такого розміру без взаємодії з амілоїдогенними послідовностями інсуліну. Таким чином, амілоїдогенні послідовності є «доступними» для утворення β -складчастої структури, проте зростання агрегатів білка з лінійною геометрією пригнічується. Присутність $PcHfQStr$ суттєво пригнічує утворення амілоїдних фібрил, зменшує їх діаметр і індукує подовження філаментів, пригнічуючи латеральну агрегацію.

Зв'язування фталоціаніну з білковою молекулою визначається не тільки плоскою ароматичною системою фталоціаніну, але і його лігандом. Аксіальні замісники різної структури та геометрії можуть або забезпечувати конкретну ділянку взаємодії молекули фталоціаніну у структурі білка, або накладати стеричні обмеження на зв'язування (рис. 5.9).

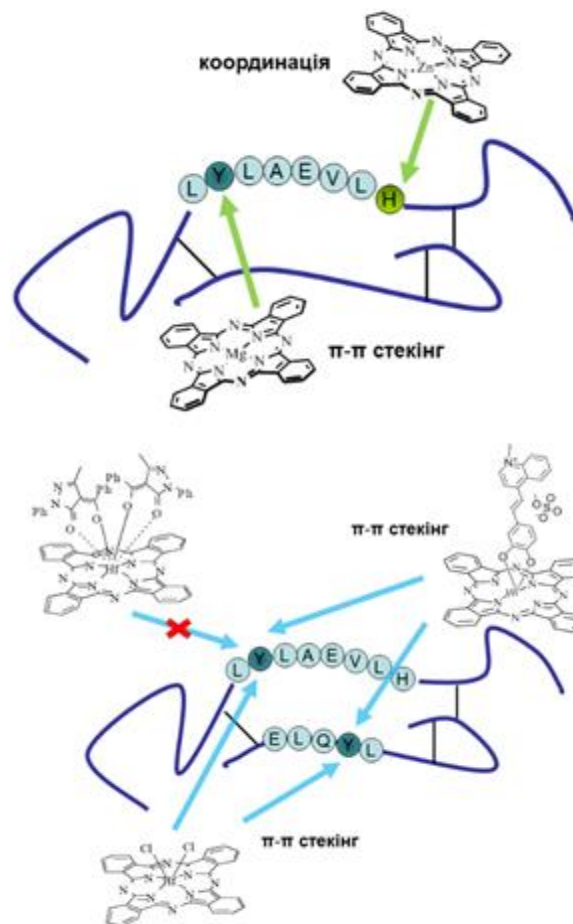


Рис. 5.9. Схема інсуліну людини. Наведені дві амліоїдогенні послідовності, розташовані у В- та А-ланцюгах. Додатково вказано розташування залишків тирозину Y14, Y16 та гістидину H10, що пропонуються як можливі місця зв'язування досліджуваних комплексів

Вивчені фталоціаніни та порфіразини (у відповідних парах) мають схожі фізико-хімічні властивості, такі як розчинність, координаційна здатність іонів центральних металів. Таким чином, відмінності в дії комплексів Zn і Mg на інтенсивність фібрилізації можна пояснити здатністю іона Zn координувати залишки амінокислот гістидину та цистеїну в білках [164].

У інсуліні гістидиновий залишок H10 (рис. 5) бере участь у формуванні гексамеру за координацією Zn^{+2} [165]. Цей H10 розташований поблизу

амілоїдогенної послідовності (11) LVEALYL (17) в ланцюзі інсуліну В, що відповідає за формування остову фібрили (рис 5.9).

Завдяки згаданій «спорідненості» цинку до залишку гістидину, комплекси Zn та Mg можуть надавати перевагу різним сайтам зв'язування у амілоїдогенній послідовності інсуліну. У випадку Mg-вмісного комплексу він, переважно, кріпиться до тирозинового залишку всередині амілоїдогенної послідовності інсуліну, що утворює остов фібрили. Zn-вмісні комплекси переважно зв'язуються на периферії остову фібрили через їх координацію з залишком гістидину. У цьому випадку Mg-вмісні комплекси можуть пригнічувати утворення інсулінових фібрил з більшою ефективністю у порівнянні з Zn-вмісними комплексами, що призводить до зниження інтенсивності флуоресцентної відповіді амілоїдчутливого барвника. Також ми можемо припустити, що завдяки своєму розташуванню в фібрилярному остові молекула комплексів Mg перешкоджає зв'язуванню барвника сильніше, ніж молекула Zn-комплексів. Це забезпечить додаткове зменшення флуоресцентної реакції барвника у випадку Mg-вмісних комплексів. У підсумку, було виявлено ефективні інгібітори амілоїдної агрегації білків.

Висновки до розділу:

1. Методом спектроскопії електронного поглинання було показано, що аксіально координовані фталоціаніни з більш високою схильністю до самоасоціації виявляють більш високу інгібуючу активність у реакції фібрилоутворення у порівнянні з комплексами, що мають низьку схильність до самоасоціації. У той же час самоасоціати не беруть безпосередньої участі в механізмі інгібування фібрилоутворення інсуліну, тому що фталоціаніни зв'язуються з білком в мономерній формі. Показано руйнування самоасоціатів фталоціаніну в присутності інсулінових амілоїдних фібрил методом спектроскопії електронного поглинання, що свідчить про утворення комплексу між ними. Можна припустити, що

схильність фталоціанінів до самоасоціації є «індикатором» їх взаємодії з ароматичними амінокислотами білка та їх антифібрилlogenних властивостей.

2. Досліджено можливість використання поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії на наночастинках срібла для характеристики взаємодії між молекулою фталоціаніну та амілоїдними фібрилами. Також було показано утворення комплексу між амілоїдними фібрилами і фталоціаніном. Найбільший приріст інтенсивності піків фталоціаніну в раманівському спектрі в присутності фібрил інсуліну становить 10 разів для молярного співвідношення фібрили: фталоціанін 1:3,5.

За результатами даного дослідження опубліковані наукові праці:

1. Characterization of the Interaction between Phthalocyanine and Amyloid Fibrils by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). M. Losytskyy, N. Akbay, S. Chernii, et al. // Analytical Letters. –2018. DOI: 10.1080/00032719.2017.1321655.
2. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyy, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2018. e2660. doi 10.1002/jmr.2660.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вирішується проблема створення високоефективних інгібіторів амілоїдної агрегації білків, що є причиною ряду патологічних станів, на основі фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками.

1. Вперше досліджено інгібуючу активність серії фталоціанінів та порфіразинів на процес амілоїдної агрегації білків. Показано, що вплив таких сполук на кінетику фібрилоутворення білків та морфологію утворених агрегатів (тобто взаємодія між макроциклічним металокомплексом та агрегаційним інтермедіатом білка) в значній мірі визначається:

- природою та геометрією позаплощинного ліганду у випадку аксіально-координованих фталоціанінів;
- природою та координаційною здатністю «відкритого» центрального атома металу у випадку планарних фталоціанінів і порфіразинів;
- наявністю об'ємних замісників по периферії макроциклу, тобто його геометрією.

2. Встановлено, що інтенсивність утворення амілоїдних агрегатів білків може суттєво пригнічуватись аксіально-координованими фталоціанінами. Досліджувані комплекси можуть суттєво (до 96%) пригнічувати інтенсивність реакції амілоїдної агрегації. Фталоціаніни гафнію та цирконію, що містять хіноліновий стириловий ліганд пропонуються як агенти з високою антифібрилогенною активністю. Для них ефективна концентрація інгібітору IC_{50} становить $0,16 \mu\text{M}$ для PcZrQStr та $0,11 \mu\text{M}$ для PcHfQStr .

3. Встановлено, що морфологія продуктів амілоїдної агрегації білків залежить від природи та геометрії ліганду аксіально-координованих фталоціанінів. Реакція фібрилоутворення інсуліну була переспрямована у бік формування олігомерних агрегатів 2-10 нм (фталоціанінами PcHfCl_2 та PcZrDbm_2), аморфних структур діаметром до 100 нм (PcHfCl_2), протофіламентів

близько 0,8 нм у діаметрі (PcHfQstr). Для лізоциму, присутність аксіально-координованих фталоціанінів призводила до збільшення довжини та зменшення діаметру філаментів.

4. Показано, що у реакції агрегації білків фталоціанінові комплекси з високою здатністю до самоасоціації (до π - π стекингу) проявляють високу інгібуючу активність. Такі макроциклічні сполуки також здатні до асоціації зі сформованими фібрилами.

5. Утворення комплексів між сформованими амілоїдними фібрилами та фталоціаніном було показано методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Найбільше підвищення інтенсивності піків фталоціаніну у раманівському спектрі у присутності фібрил інсуліну становило 10 разів для молярного співвідношення фібрили:фталоціанін 1:3,5. Таким чином, показано можливість детекції амілоїдних фібрил за допомогою фталоціанінів цим методом.

6. Досліджено флуоресцентну чутливість до амілоїдних фібрил інсуліну серії стирилпіридинових барвників, що виявляють підвищення інтенсивності флуоресценції до 23 разів. Показано можливість визначення амілоїдних фібрил триметиновим ціаніновим барвником із застосуванням методу підсилення флуоресценції поверхнею металу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sami N, Rahman S, Kumar V, Zaidi S, Islam A, Ali S, et al. Protein aggregation, misfolding and consequential human neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci*. 2017;127(11):1047–57.
2. Ellisdon AM, Bottomley SP. The role of protein misfolding in the pathogenesis of human diseases. *IUBMB Life*. 2004;56(3):119–23.
3. Uversky VN, Fink AL. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2004 May 6;1698(2):131–53.
4. Sipe JD, Cohen AS. Review: History of the Amyloid Fibril. *J Struct Biol*. 2000 Jun;130(2–3):88–98.
5. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* Vol 86. 2017;86(May):27–68.
6. Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*. 2000 Nov 15;41(3):415–27.
7. Shirahama T, Benson MD, Cohen AS, Tanaka A. Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains: an electron microscopic study. *J Immunol*. 1973 Jan;110(1):21–30.
8. Chiti F, Bucciantini M, Capanni C, Taddei N, Dobson CM, Stefani M. Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. *Protein Sci*. 2001 Dec;10(12):2541–7.
9. Paravastu AK, Leapman RD, Yau W, Tycko R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer ’ s β -amyloid fibrils. 2008;105(47).
10. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction 1 1 Edited by F. E. Cohen. *J Mol Biol*. 1997 Oct 31;273(3):729–39.

11. Eisenberg D, Jucker M. Review The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell*. 2012;148(6):1188–203.
12. Sunde M, Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem*. 1997;50:123–59.
13. Lee S, Mou Y, Lin S, Chou F, Tseng W, Chen C, et al. Steric Zipper of the Amyloid Fibrils Formed by Residues 109 – 122 of the Syrian Hamster Prion Protein. 2008;1142–54.
14. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. 2016;(December):1–27.
15. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. 2004;34:151–60.
16. Mathis CA, Mason NS, Lopresti BJ, Klunk WE. Development of Positron Emission Tomography β -Amyloid Plaque Imaging Agents. *YSNUC*. 2012;42(6):423–32.
17. Dobson CM. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. 2002;21(21).
18. Knowles TP. Role of Intermolecular Forces in. 2014;1900(2007).
19. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):900–904.
20. Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:3–16.
21. Shamsi TN, Athar T, Parveen R, Fatima S. A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments. *Int J Biol Macromol*. 2017;105:993–1000.
22. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* (80-). 2016 Jul 1;353(6294):aac4354-aac4354.
23. Baldwin AJ, Knowles TPJ, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shamma SL, et al. Metastability of Native Proteins and the Phenomenon of Amyloid Formation. *J Am Chem Soc*. 2011 Sep 14;133(36):14160–3.

24. Gazit E. The "Correctly Folded" state of proteins: is it a metastable state? *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002 Jan 18;41(2):257–9.
25. Jahn TR, Radford SE. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* 2005 Nov 10;272(23):5962–70.
26. Tycko R. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q Rev Biophys.* 2006 Feb 13;39(1):1–55.
27. Gsponer J, Vendruscolo M. Theoretical approaches to protein aggregation. *Protein Pept Lett.* 2006;13(3):287–93.
28. Caughey WS, Priola SA, Kocisko DA, Raymond LD, Ward A, Caughey B. Cyclic tetrapyrrole sulfonation, metals, and oligomerization in antiprion activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Nov 1;51(11):3887–94.
29. Kumar V, Sami N, Kashav T, Islam A, Ahmad F, Hassan MI. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *Eur J Med Chem.* 2016 Nov 29;124:1105–20.
30. Herczenik E, Gebbink MFBG. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* 2008 Jul;22(7):2115–33.
31. Siddiqi MK, Alam P, Chaturvedi SK, Shahein YE, Khan RH. Mechanisms of protein aggregation and inhibition. *Front Biosci (Elite Ed).* 2017;9:1–20.
32. Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH. Protein Misfolding and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006 Sep;7(1):103–24.
33. Konno T. Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's beta(25-35) amyloid fibril. *Biochemistry.* 2001 Feb 20;40(7):2148–54.
34. Ciani B, Hutchinson EG, Sessions RB, Woolfson DN. A Designed System for Assessing How Sequence Affects α to β Conformational Transitions in Proteins. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10150–5.
35. Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature.* 2003 Aug 14;424(6950):805–8.
36. Tjernberg L, Hosia W, Bark N, Thyberg J, Johansson J. Charge Attraction and

β Propensity Are Necessary for Amyloid Fibril Formation from Tetrapeptides. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):43243–6.

37. Goldsbury C, Goldie K, Pellaud J, Seelig J, Frey P, Müller SA, et al. Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin. *J Struct Biol*. 2000;130(2–3):352–62.

38. Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID, Dobson CM. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4224–8.

39. Fändrich M, Fletcher MA, Dobson CM. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*. 2001 Mar 8;410(6825):165–6.

40. Lin W-L, DeLucia MW, Dickson DW. Alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 9;354(2):99–102.

41. Antony T, Hoyer W, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Cellular Polyamines Promote the Aggregation of α -Synuclein. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):3235–40.

42. Assayag K, Yakunin E, Loeb V, Selkoe DJ, Sharon R. Polyunsaturated fatty acids induce α -synuclein-related pathogenic changes in neuronal cells. *Am J Pathol*. 2007;171(6):2000–11.

43. Brange J, Andersen L, Laursen ED, Meyn G, Rasmussen E. Toward Understanding Insulin Fibrillation. *J Pharm Sci*. 1997 May;86(5):517–25.

44. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):11753–9.

45. Kelly JW. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol*. 1998 Feb;8(1):101–6.

46. Lansbury PT. Inhibition of amyloid formation : Alzheimer ' s disease. *Science* (80-). :260–7.

47. Goers J, Permyakov SE, Permyakov EA, Uversky VN, Fink AL. Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry*. 2002 Oct 15;41(41):12546–51.

48. Lindquist SL, Kelly JW. Chemical and Biological Approaches for Adapting Proteostasis to Ameliorate Protein Misfolding and Aggregation Diseases-Progress and Prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Dec 1;3(12):a004507–a004507.
49. Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol.* 2011 Sep;7(9):602–9.
50. Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, et al. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein. *Cell.* 2012 May 25;149(5):1048–59.
51. Chiti F, Dobson CM. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol.* 2009 Jan 1;5(1):15–22.
52. Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Direct Observation of Amyloid Fibril Growth Monitored by Thioflavin T Fluorescence. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):16462–5.
53. Morris AM, Watzky MA, Finke RG. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2009 Mar;1794(3):375–97.
54. Arosio P, Knowles TPJ, Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys Chem Chem Phys.* 2015 Mar 28;17(12):7606–18.
55. Ferrone FA. Assembly of A β proceeds via monomeric nuclei. *J Mol Biol.* 2015 Jan 30;427(2):287–90.
56. Abedini A, Schmidt AM. Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Lett.* 2013 Apr 17;587(8):1119–27.
57. Gupta Y, Singla G, Singla R. Insulin-derived amyloidosis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(1):174–7.
58. Ruberg FL, Berk JL. Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation.* 2012 Sep 4;126(10):1286–300.
59. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 15;90(2):567–71.
60. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid

- beta protein toxicity. *Cell*. 1994 Jun 17;77(6):817–27.
61. Terry CJ, Damas AM, Oliveira P, Saraiva MJ, Alves IL, Costa PP, et al. Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J*. 1993;12(2):735–41.
 62. Schormann N, Murrell JR, Liepnieks JJ, Benson MD. Tertiary structure of an amyloid immunoglobulin light chain protein: a proposed model for amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9490–4.
 63. Becker JW, Reeke GN. Three-dimensional structure of beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(12):4225–9.
 64. Yazaki M, Yoshinaga T, Sekijima Y, Kametani F, Okumura N. Hereditary Fibrinogen A α -Chain Amyloidosis in Asia: Clinical and Molecular Characteristics. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 22;19(1).
 65. Gillmore JD, Booth DR, Madhoo S, Pepys MB, Hawkins PN. Hereditary renal amyloidosis associated with variant lysozyme in a large English family. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Nov;14(11):2639–44.
 66. Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, et al. The crystal structure of plasma gelsolin: Implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell*. 1997;90(4):661–70.
 67. Ivanova MI, Sievers SA, Guenther EL, Johnson LM, Winkler DD, Galaleldeen A, et al. Aggregation-triggering segments of SOD1 fibril formation support a common pathway for familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(1):197–201.
 68. Ivanova MI, Sievers SA, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(45):18990–5.
 69. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(11):3881–5.
 70. Gusarov D, Lasman V, Bayramashvili D. Methods for protecting silica sorbents used in high-performance liquid chromatography from strongly adsorbed impurities during purification of human recombinant insulin. *J Chromatogr B Anal Technol*

- Biomed Life Sci. 2007;853(1–2):354–9.
71. Wilhelm KR, Yanamandra K, Gruden MA, Zamotin V, Malisauskas M, Casaite V, et al. Immune reactivity towards insulin, its amyloid and protein S100B in blood sera of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol.* 2007;14(3):327–34.
 72. Jansen R, Dzwolak W, Winter R. Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys J.* 2005;88(2):1344–53.
 73. М. И. Дюков, М. П. Грудинин, А. К. Сироткин ОИК. Фибриллогенез инсулина *in vitro*. 2006;5(April):246–8.
 74. Некипелова ВО. Агрегация инсулина в растворах. 2009;3–9.
 75. Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y. Analysis of Core Region from Egg White Lysozyme Forming Amyloid Fibrils. *Int J Biol Sci.* 2013;9(2):219–27.
 76. Cao A, Hu D, Lai L. Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme. *Protein Sci.* 2004;13(2):319–24.
 77. Bartolini M, Andrisano V. Strategies for the Inhibition of Protein Aggregation in Human Diseases. *ChemBioChem.* 2010 Apr 16;11(8):1018–35.
 78. Denny RA, Gavrin LK, Saiah E. Recent developments in targeting protein misfolding diseases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Apr 1;23(7):1935–44.
 79. Sousa MM, Saraiva MJ. Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. *Prog Neurobiol.* 2003 Dec;71(5):385–400.
 80. Miroy GJ, Lai Z, Lashuel HA, Peterson SA, Strang C, Kelly JW. Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 24;93(26):15051–6.
 81. Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* 2001 Jun 8;498(2–3):204–7.
 82. PERMANNE B, ADESSI C, SABORIO GP, FRAGA S, FROSSARD M-J, VAN DORPE J, et al. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a β -sheet breaker peptide. *FASEB J.* 2002 Jun;16(8):860–2.

83. Hughes E, Burke RM, Doig AJ. Inhibition of Toxicity in the β -Amyloid Peptide Fragment β -(25–35) Using *N*-Methylated Derivatives. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25109–15.
84. Sacchettini JC, Kelly JW. Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Apr;1(4):267–75.
85. Porat Y, Abramowitz A, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des*. 2006;67(1):27–37.
86. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999 Jul 8;400(6740):173–7.
87. Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, Chang L, Morgan TE, Yu J, et al. Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem*. 2001 Nov;79(3):595–605.
88. Griffiths HH, Morten IJ, Hooper NM. Emerging and potential therapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Jun 15;12(6):693–704.
89. Shorter J. Engineering therapeutic protein disaggregases. *Mol Biol Cell*. 2016;27(10):1556–60.
90. Taneja V, Verma M, Vats A. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol*. 2014;18(2):138.
91. Melki R, Savistchenko J, Pavone F, Nosi D, Bucciantini M, Forzan M, et al. Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *FASEB J*. 2011;26(2):818–31.
92. Amar F, Sherman MA, Rush T, Larson M, Boyle G, Chang L, et al. The amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations in neuronal signaling that lead to tau phosphorylation and aggregation. *Sci Signal*. 2017 May 9;10(478):eaal2021.
93. Taglialegna A, Lasa I, Valle J. Amyloid Structures as Biofilm Matrix Scaffolds. O'Toole GA, editor. *J Bacteriol*. 2016 Oct 1;198(19):2579–88.
94. Sawyer EB, Claessen D, Gras SL, Perrett S. Exploiting amyloid: how and why bacteria use cross- β fibrils. *Biochem Soc Trans*. 2012 Aug 1;40(4):728–34.

95. Alteri CJ, Xicohténcatl-Cortes J, Hess S, Caballero-Olín G, Girón JA, Friedman RL. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5145–50.
96. Romero D, Kolter R. Functional amyloids in bacteria. *Int Microbiol*. 2014 Jun;17(2):65–73.
97. Boesen T, Nielsen LP. Molecular Dissection of Bacterial Nanowires. *MBio*. 2013 May 7;4(3):e00270-13.
98. Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP, Chapman MR. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol*. 2012 Feb;20(2):66–73.
99. Evans ML, Chapman MR. Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014 Aug;1843(8):1551–8.
100. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*. 2001 Mar;39(6):1452–63.
101. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*. 1989 Apr 20;338(6217):652–5.
102. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. 1995 Nov;18(4):661–70.
103. Wang X, Smith DR, Jones JW, Chapman MR. In Vitro Polymerization of a Functional *Escherichia coli* Amyloid Protein. *J Biol Chem*. 2006 Nov 30;282(6):3713–9.
104. Kim J-Y, Sahu S, Yau Y-H, Wang X, Shochat SG, Nielsen PH, et al. Detection of Pathogenic Biofilms with Bacterial Amyloid Targeting Fluorescent Probe, CDy11. *J Am Chem Soc*. 2016 Jan 13;138(1):402–7.
105. Van Gerven N, Van der Verren SE, Reiter DM, Remaut H. The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence. *J Mol Biol*. 2018 Oct 12;430(20):3657–84.

106. Patel KB, Toh E, Fernandez XB, Hanuszkiewicz A, Hardy GG, Brun Y V, et al. Functional characterization of UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferases of *Escherichia coli* and *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 2012 May 15;194(10):2646–57.
107. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, Cusumano CK, Hung CS, Chorell E, et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol.* 2009 Dec 25;5(12):913–9.
108. Oli MW, Otoo HN, Crowley PJ, Heim KP, Nascimento MM, Ramsook CB, et al. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2012 Dec 1;158(Pt_12):2903–16.
109. Ladiwala ARA, Bhattacharya M, Perchiacca JM, Cao P, Raleigh DP, Abedini A, et al. Rational design of potent domain antibody inhibitors of amyloid fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Dec 4;109(49):19965–70.
110. Ruggeri FS, Habchi J, Cerreta A, Dietler G. AFM-Based Single Molecule Techniques: Unraveling the Amyloid Pathogenic Species. *Curr Pharm Des.* 2016;22(26):3950–70.
111. Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 26;1502(1):16–30.
112. Westermark GT, Johnson KH, Westermark P. Staining methods for identification of amyloid in tissue. *Methods Enzymol.* 1999;309:3–25.
113. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm Res.* 2008 Jul 3;25(7):1487–99.
114. Viriot ML, Carré MC, Geoffroy-Chapotot C, Brembilla A, Muller S, Stoltz JF. Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1998 Oct;19(2):151–60.
115. Churches QI, Caine J, Cavanagh K, Epa VC, Waddington L, Tranberg CE, et al. Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid beta aggregation. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2014;24(14):3108–12.
116. Сапожников С.П., Карышев П.Б., Шептухина А.И., Николаева О.В., Авруйская А.А., Митрасов Ю.Н. КВА. Новые флуоресцентные зонды для

выявления амилоида. Клиническая медицина. 2017;9(2):91–8.

117. Volkova K, Kovalska V, Inshin D, Slominskii Y, Tolmachev O, Yarmoluk S. Novel fluorescent trimethine cyanine dye 7519 for amyloid fibril inhibition assay. *Biotech Histochem*. 2011 Jun 8;86(3):188–91.

118. Liu T, Bitan G. Modulating Self-Assembly of Amyloidogenic Proteins as a Therapeutic Approach for Neurodegenerative Diseases : Strategies and Mechanisms. 2012;90095:359–74.

119. Valiente-Gabioud AA, Miotto MC, Chesta ME, Lombardo V, Binolfi A, Fernández CO. Phthalocyanines as Molecular Scaffolds to Block Disease-Associated Protein Aggregation. *Acc Chem Res*. 2016;49(5):801–8.

120. Howlett D, Cutler P, Heales S, Camilleri P. Hemin and related porphyrins inhibit β -amyloid aggregation. *FEBS Lett*. 1997;417(2):249–51.

121. Frydman-Marom A, Rechter M, Shefler I, Bram Y, Shalev DE, Gazit E. Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies. *Angew Chemie - Int Ed*. 2009;48(11):1981–6.

122. Necula M, Kaye R, Milton S, Glabe CG. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid ?? oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J Biol Chem*. 2007;282(14):10311–24.

123. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(6):558–66.

124. Werner P, Giveon SM. Discriminatory behavior of family physicians toward a person with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatrics*. 2008;20(4):824–39.

125. Chopra V, Fox JH, Lieberman G, Dorsey K, Matson W, Waldmeier P, et al. A small-molecule therapeutic lead for Huntington's disease: preclinical pharmacology and efficacy of C2-8 in the R6/2 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(42):16685–9.

126. Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12117–22.

127. Priola SA, Raines A, Caughey WS. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* (80-). 2000;287(5457):1503–6.
128. Wang Q, Yu X, Patel K, Hu R, Chuang SSC, Zhang G, et al. Tanshinones Inhibit Amyloid Aggregation by Amyloid- β Peptide , Disaggregate Amyloid Fibrils , and Protect Cultured Cells Tanshinones Inhibit Amyloid Aggregation by Amyloid- β Peptide , Disaggregate Department of Chemical and Biomolecular Engineering Depart. 2013;
129. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5892–901.
130. Lamberto GR, Torres-Monserrat V, Bertoncini CW, Salvatella X, Zweckstetter M, Griesinger C, et al. Toward the Discovery of Effective Polycyclic Inhibitors of α -Synuclein Amyloid Assembly. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32036–44.
131. Lamberto GR, Binolfi A, Orcellet ML, Bertoncini CW, Zweckstetter M, Griesinger C, et al. Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α -synuclein amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Dec 15;106(50):21057–62.
132. M. A. Griffiths BWW and MW. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:873–876.
133. Kinsella TJ, Baron ED, Colussi VC, Cooper KD, Hoppel CL, Ingalls ST, et al. Preliminary Clinical and Pharmacologic Investigation of Photodynamic Therapy with the Silicon Phthalocyanine Photosensitizer Pc 4 for Primary or Metastatic Cutaneous Cancers. *Front Oncol*. 2011;1:14.
134. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1996;32(3):159–64.
135. Abdel-Haq H, Lu M, Cardone F, Liu QG, Puopolo M, Pocchiari M. Efficacy of phthalocyanine tetrasulfonate against mouse-adapted human prion strains. *Arch Virol*.

2009;154(6):1005–7.

136. Lee EN, Cho HJ, Lee CH, Lee D, Chung KC, Paik SR. Phthalocyanine Tetrasulfonates Affect the Amyloid Formation and Cytotoxicity of α -Synuclein. *Biochemistry*. 2004;43(12):3704–15.

137. Akoury E, Gajda M, Pickhardt M, Biernat J, Soraya P, Griesinger C, et al. Inhibition of Tau Filament Formation by Conformational Modulation. *J Am Chem Soc*. 2013 Feb 20;135(7):2853–62.

138. Yao S, Cherny RA, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid β -peptide by NMR. *J Pept Sci*. 2004 Apr;10(4):210–7.

139. Kovalska V, Losytskyy M, Chernii V, Volkova K, Tretyakova I, Cherepanov V, et al. Studies of anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines of zirconium containing out-of-plane ligands. *Bioorganic Med Chem*. 2012;20(1):330–4.

140. Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. 2001;80(5):2093–109.

141. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.

142. Kuperman M V., Chernii S V., Losytskyy MY, Kryvorotenko D V., Derevyanko NO, Slominskii YL, et al. Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: The effect of N,N'-substituents. *Anal Biochem*. 2015 Sep 1;484:9–17.

143. Lakowicz JR, Shen Y, D'Auria S, Malicka J, Fang J, Gryczynski Z, et al. Radiative Decay Engineering. *Anal Biochem*. 2002 Feb 15;301(2):261–77.

144. Ogul'chansky TYu, Losytskyy MYu, Kovalska VB, Yashchuk VM, Yarmoluk SM. Interactions of cyanine dyes with nucleic acids. XXIV. Aggregation of monomethine cyanine dyes in presence of DNA and its manifestation in absorption and fluorescence spectra. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2001 Jun;57(7):1525–32.

145. Herz AH. No TitleDye-Dye interactions of cyanines in solution and at AgBr surfaces. *Photogr Sci Engeneering*. 1974;18:323–35.

146. Guo S, Akhremitchev BB. Packing density and structural heterogeneity of insulin amyloid fibrils measured by AFM nanoindentation. *Biomacromolecules*.

2006;7(5):1630–6.

147. Selivanova OM, Galzitskaya O V. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein. *Biochemistry*. 2012;77(11):1237–47.

148. Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson C V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci*. 2000;9(10):1960–7.

149. Grudzielanek S, Velkova A, Shukla A, Smirnovas V, Tatarek-Nossol M, Rehage H, et al. Cytotoxicity of Insulin within its Self-assembly and Amyloidogenic Pathways. *J Mol Biol*. 2007;370(2):372–84.

150. Lee CF. Self-assembly of protein amyloids: A competition between amorphous and ordered aggregation. *Phys Rev E*. 2009 Sep 30;80(3):031922.

151. Jiménez JL, Tennent G, Pepys M, Saibil HR. Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*. 2001;311(2):241–7.

152. Arnaudov LN, De Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophys J*. 2005;88(1):515–26.

153. Georgalis Y, Starikov EB, Hollenbach B, Lurz R, Scherzinger E, Saenger W, et al. Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6118–21.

154. *The Theory of Polymer Dynamics*.

155. Streets AM, Sourigues Y, Kopito RR, Melki R, Quake SR. Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence Reveals Complex Aggregation Kinetics. *PLoS One*. 2013;8(1):1–10.

156. Wu Z, Liu Y, Zhou X, Shen A, Hu J. A “turn-off” SERS-based detection platform for ultrasensitive detection of thrombin based on enzymatic assays. *Biosens Bioelectron*. 2013;44(1):10–5.

157. Xu H, Mao X, Zeng Q, Wang S, Kawde A, Liu G, et al. Aptamer-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for Protein Analysis
Aptamer-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for Protein. 2009;81(2):669–75.

158. Langhammer C, Yuan Z, Zorić I, Kasemo B. Plasmonic properties of supported Pt and Pd nanostructures. *Nano Lett.* 2006;6(4):833–8.
159. Alvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM. SERS detection of small inorganic molecules and ions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(45):11214–23.
160. Macaskil A, Chernonosov AA, Koval V V., Lukyanets EA, Fedorova OS, Smith WE, et al. Quantitative surface-enhanced resonance Raman scattering of phthalocyanine-labelled oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):2–7.
161. Clavijot RE, Aroca R, Kovacs GJ, Jennings CA, Duff J. Raman Spectra of Thin Solid Films 3--Mg, Cu and Zn Phthalocyanine Complexes. 1989;20(December 1988).
162. Kumar CSSR. Raman spectroscopy for nanomaterials characterization. Vol. 9783642206, *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization.* 2012. 1-645 p.
163. Han XX, Xie Y, Zhao B, Ozaki Y. Letters to Analytical Chemistry Highly Sensitive Protein Concentration Assay over a Wide Range via Surface-Enhanced Raman Scattering of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Chem.* 2010;82(11):4325–8.
164. Mutter AC, Norman JA, Tiedemann MT, Singh S, Sha S, Morsi S, et al. Rational design of a zinc phthalocyanine binding protein. *J Struct Biol.* 2014;185(2):178–85.
165. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships [Internet].* Endotext. 2000.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin / V. Kovalska, **S. Chernii**, M. Losytskyu, J. Ostapko, I. Tretyakova, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2018. – Vol. 31(1). – e2660. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціанінів та порфіразинів магнію та цинку на фібрилоутворення, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

2. Characterization of the interaction between phthalocyanine and amyloid fibrils by surface-enhanced raman scattering (SERS) / M. Losytskyu, N. Akbay, **S. Chernii**, E. Avci, V. Chernii, S. Yarmoluk, M. Culha, V. Kovalska // Analytical Letters. – 2018. – Vol. 51(1-2). – P. 221-228. *Особистий внесок здобувача – отримання зразків фібрил, обробка результатів.*

3. The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme / V. Kovalska, **S. Chernii**, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, O. Varzatskii, A. Naumovets, S. Yarmoluk // Journal of Molecular Recognition. – 2017. – Vol. 30(8). – e2622. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності фталоціаніну з аксіально-координованим замісником на фібрилоутворення спектральними методами, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.*

4. Design of 4-(4-dialkylaminostyryl)-pyridinium dyes for fluorescent detection of amyloid fibrils / D. Inshyn, **S. Chernii**, V. Kovalska, S. Yarmoluk // Biopolymers and Cell. – 2017. – Vol. 32(4). – P. 289-299. *Особистий внесок здобувача –*

дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей серії стрилпіридинових барвників як зондів для детекції амілоїдних фібрил, обробка результатів, участь у написанні статті, підготовка статті до друку.

5. Anti-fibrillogenic properties of phthalocyanines: effect of the out-of-plane ligands / V. Kovalska, V. Cherepanov, **S. Chernii**, M. Losytskyu, A. Senenko, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol.22(24). – P. 6918-6923. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення інсуліну, обробка результатів, участь у написанні статті.*

6. Towards the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines with out-of-plane ligands: correlation with self-association proneness / V. Kovalska, M. Losytskyu, **S. Chernii**, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29(6). – P. 473-479. *Особистий внесок здобувача – дослідження інгібуючої активності серії фталоціанінів з аксіально-координованими замісниками на фібрилоутворення, дослідження їх агрегаційних властивостей, підготовка статті до друку.*

Тези наукових доповідей

1. Study of inhibitory activity of phthalocyanine-related complexes against pathological amyloid aggregation / S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii S. Yarmoluk, V. Kovalska // Abstract of FEBS Advanced course 2018 «Hydrodynamic and thermodynamic analysis of biological macromolecules and their interactions» September 23-28, Prague, Czech Republic, P. 24.

2. β -ketoenole dye as an amyloid-sensitive fluorescent probe for bacterial biofilm investigation / S. Chernii, O. Moshynets, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine, P.

3. Spectral-luminescent characterization of β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyy, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk, V. Kovalska // "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2017) Chernivtsi, Ukraine. P. 158.
4. β -ketoenoles as amyloid-sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection / S. Chernii, M. Losytskyy, A. Gorski, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, V. Kovalska // XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals" (XXIII ISSSMC) 2017 Kyiv, Ukraine. P.221
5. Use of SERS for characterization of interaction between phthalocyaninecomplex and amyloid fibrils / M. Losytskyy, N. Akbay, S. Chernii, E. Avci, V. Chernii, M. Culha, V. Kovalska // International conference 10th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2016), Çanakkale, Turkey. P. 324.
6. The effect of Zn and Mg phthalocyanines on insulin amyloid aggregation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyy, J. Ostapko, A. Gorski, V. Chernii, S. Yarmoluk // VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2016» (ХКЧ'16) Харків, Україна. P.13-14.
7. Effect of the macrocyclic metal complexes on lysozyme amyloid aggregation S.V. Chernii, V. Kovalska, V. Cherepanov, M. Losytskyy, I. Tretyakova, O. Varzatskyy, S. Yarmoluk // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects October 1-4 2015, Kyiv, Ukraine. P.43.
8. Effect of the out-of-plane ligands on the anti-fibrillogenic activity of phthalocyanine complexes / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyy, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // XIX конференція з неорганічної хімії за участю закордонних учених, 7-11.09.2014, Одеса, Україна, С.26.
9. Amino-substituted β -ketoenole dyes for fluorescent detection of amyloid fibril / S. Chernii, N. Akbay, V. Chernii, I. Tretyakova, Ya. Dovbiy, V. Kovalska // The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF), September 13-16 2015 Würzburg, Germany, P.99.

10. Anti-fibrillogenic activity of the phthalocyanine complexes: Role of the out-of plane ligands / V. Kovalska, S. Chernii, V. Cherepanov, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk, S. Volkov // International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2014), 23-30.08.2014, Lviv, Ukraine P.91-92.
11. Phthalocyanines with out-of-plane quinolinium styryl ligand as inhibitors of insulin amyloid fibrils formation / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Cherepanov, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», 29-30.05.2014, Київ, Україна. - P. 25.
12. Phthalocyanines with axially-coordinated styryl-quinolinium ligand as anti-fibrillogenic agents / S. Chernii, V. Kovalska, M. Losytskyu, V. Chernii, I. Tretyakova, S. Yarmoluk // 8 Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених з міжнародною участю „Хімічні проблеми сьогодення”, Збірник тез, 17-20.03.2014, Донецьк, Україна. - P. 157.
13. Correlation of anti-fibrillogenic activity of hafnium phthalocyanines and their tendency to self-association / V. Kovalska, S. Chernii, M. Losytskyu, V. Chernii, S. Yarmoluk // 14th International conference-school «Advanced materials and technologies» 27-31.08.2012, Palanga Lithuania. - P. 124.

ДОДАТОК Б

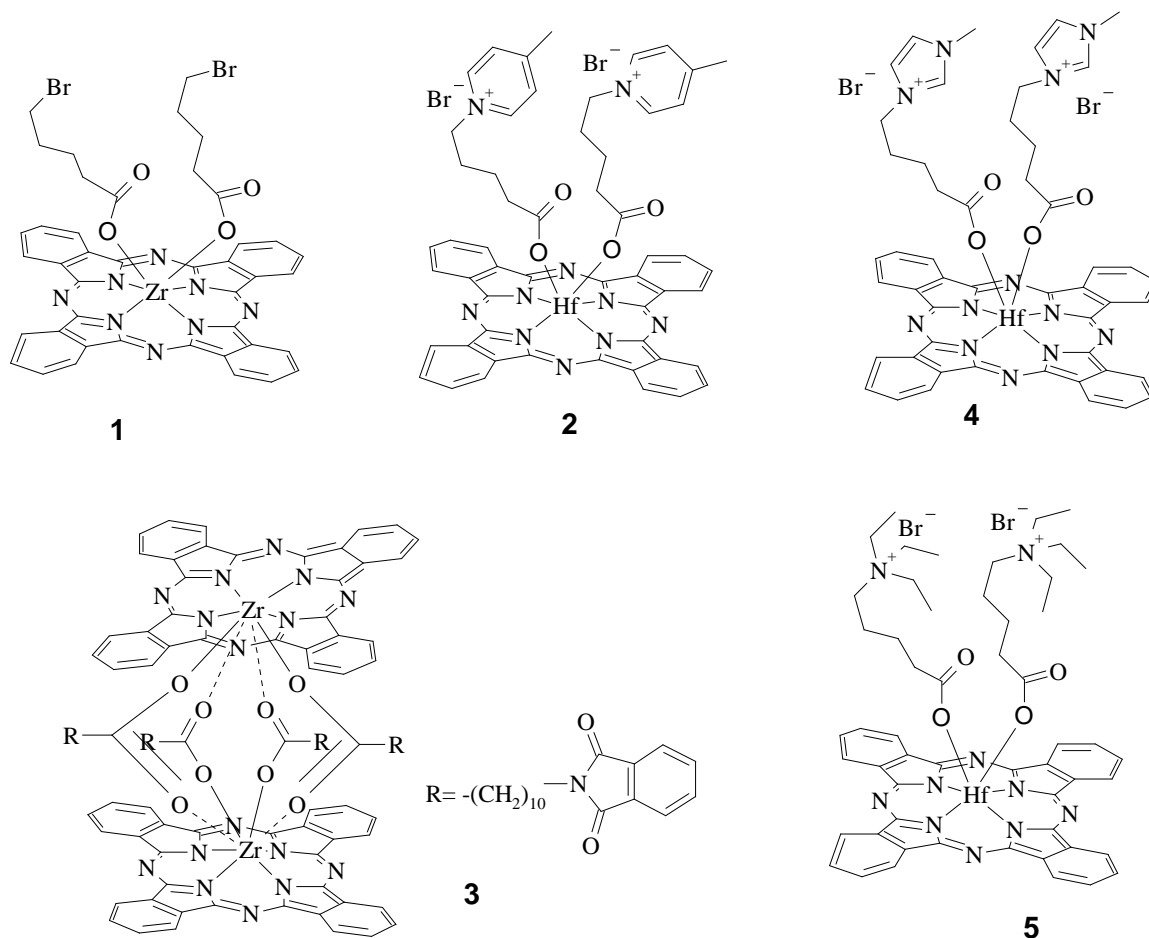
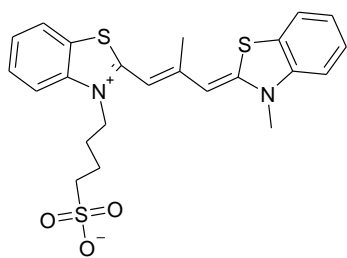
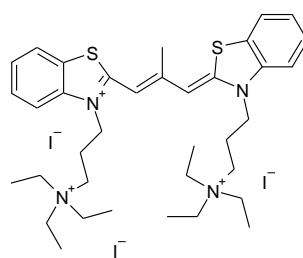


Рис. Б1. Хімічна структура фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координуваними карбоксилатними замісниками різної хімічної будови. 1 – Pс1, 2 – Pс2, 3 – Pс3, 4 – Pс5

ДОДАТОК В



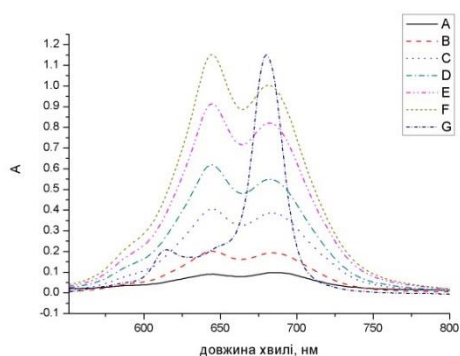
D-51



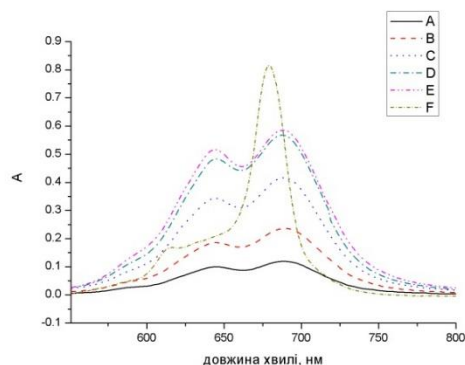
D-151

Рис. В1. Структури триметинових ціанінових барвників

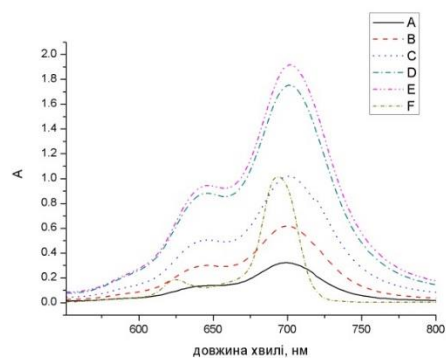
ДОДАТОК Г



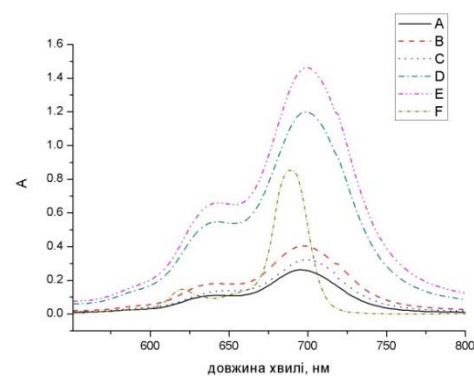
PcHfPiromelit. в буфері TRIS-HCl pH 7,9.



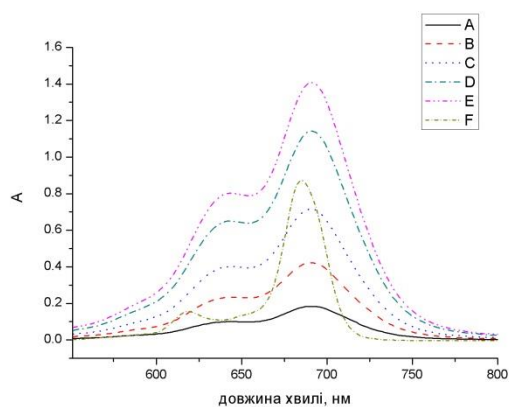
PcHfCl₂. в буфері TRIS-HCl pH 7,9.



PcHfPyr₂. в буфері TRIS-HCl pH 7,9.



PcHfDbm₂. в буфері TRIS-HCl pH 7,9.



(зліва) **PcHfBtfa₂.** в буфері TRIS-HCl pH 7,9.

Рис. Г1. Спектри поглинання фталоціанінів. Спектри наведені для концентрації 0,5-10 μM для PcHfPiromelit і 1-10 μM для PcHfBtfa2 в TRIS-HCl pH 7,9 і 5 μM в ДМСО. А – конц. 10^{-6} ; В – конц. 2×10^{-6} ; С – конц. 5×10^{-6} ; D – конц. 8×10^{-6} ; E – конц. 10^{-5} ; F – в ДМСО, конц. 5×10^{-6}