

## СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР С БЕЛКАМИ КРОВИ

Гармаза Ю.М., Зубрицкая Г.П., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»  
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru

Поступила в редакцию: 19.07.2019

**Аннотация.** Анализ параметров флуоресценции тиофлавина Т, который является специфичным для обнаружения амилоидных фибрилл, и параметров собственной флуоресценции белков крови позволил установить, что образование комплекса “амилоидные структуры – белки плазмы крови” зависит от температуры инкубации, так как связи между белками и их лигандами ослабевают при повышенных температурах. Продемонстрировано, что изменение pH среды инкубации, как в кислую, так и в щелочную области также сказывается на образовании комплексов сывороточного альбумина с амилоидными структурами, по-видимому, в результате изменения связывающей способности альбуминов при их окислении. Выявлено, что эссенциальные (Zn, Cu) микроэлементы, взаимодействуя с комплексом “амилоидные структуры – белки плазмы крови”, приводят к модификации параметров собственной и зондовой флуоресценции, что подтверждает предположение о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах для ионов металлов.

**Ключевые слова:** амилоидные структуры, белки крови, спектральные характеристики, физико-химические факторы.

### ВВЕДЕНИЕ

Важным звеном в возникновении многих нейродегенеративных заболеваний является нарушение фолдинга белков с последующим образованием амилоидных структур. При амилоидозах, когда процесс упаковки белка происходит с ошибками, агрегаты определенных размеров откладываются внутри или вне клетки как нерастворимые депозиты. Накопление амилоидных фибрилл разрушает структуру и функционирование органов и тканей, приводя к заболеванию и иногда – к летальному исходу. При изучении механизмов развития болезни Альцгеймера в ткани мозга было обнаружено присутствие амилоидных фибрилл, которые окружены мертвыми или умирающими нейронами [1]. Амилоидные отложения найдены не только при болезни Альцгеймера и Паркинсона, но и при диабете второго типа, наследственной амилоидной полинейропатии, системном амилоидозе и др. [2-4]. К сожалению, процессы, лежащие в основе аномальной агрегации белка и ее патологического проявления, изучены еще недостаточно. Выяснение молекулярных механизмов амилоидозов, установление природы амилоидных белковых структур и их свойств, развитие терапевтических методов лечения и предупреждения этих заболеваний, а также разработка их прижизненной диагностики являются актуальными задачами.

Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют, что в настоящее время не существует эффективных методов диагностики амилоидозов [5]. В последние годы складывается убеждение, что первопричиной амилоидоза нейронов и их гибели при болезни Альцгеймера является накопление постсинаптических фрагментов A $\beta$ , содержащих 40 или 42 аминокислотных остатков. Часть фрагментов приобретает структуру нормально функционирующих A $\beta$ , другая часть конформационно модифицируется в структуру патогенных A $\beta$ . На сегодняшний день известно более 20 белков, образующих амилоидные фибриллы *in vivo* и участвующих в патогенезе амилоидозов – тау-белок, хантингтин, амилин, A $\beta$ -пептиды,  $\alpha$ -синуклеин, инсулин, лизоцим, миоглобин, транстиретин и др., а также белки, амилоиды которых изучены только *in vitro* [2]. Все эти белки различаются между собой по аминокислотным последовательностям, вторичным и третичным структурам. Однако, несмотря на это, образованные ими амилоидные фибриллы имеют  $\beta$ -складчатую структуру [6].

Исследование фибрилл, полученных *ex vivo* и *in vitro*, показало, что амилоидные структуры обладают схожими морфологическими характеристиками. Все фибриллы вне зависимости от их происхождения стабилизируются сетью внешних и внутримолекулярных водородных связей между основными амидными группами цепи и карбонильными группами, которые идентичны для всех пептидов и белков. Предположено, что способность формировать амилоидные фибриллы – это неотъемлемая характеристика полипептидной цепи и большинство, если не все полипептиды, способны образовывать амилоиды, при этом их способность к самоорганизации в амилоиды может быть различной [7]. Физико-химические методы исследования амилоидов включают микроскопические, оптические и флуоресцентные методы, методы электронного парамагнитного резонанса, электрохимический и электрофоретический методы, гель-фильтрации и масс-спектрометрические методы, а также люминесцентные методы анализа, которые наиболее отражают характеристики комплексов амилоидных структур с белками крови [8].

Целью работы явилось изучение влияния физико-химических факторов (температура, pH среды, ионный состав) на образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови” методами люминесценции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческие сывороточный альбумин быка (САБ) и сывороточный альбумин человека (САЧ), растворенные в 10 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 0,155 М NaCl (забуференный NaCl), pH 7,4, до конечных концентраций от 0,2 мг/мл до 1,5 мг/мл.

Амилоидные структуры получали из лизоцима куриного яйца, растворенного в 10 мМ HCl pH 2,0 при инкубации 55°C в течение 6 суток при постоянном перемешивании [9, 10]. Ранее нами показано, что выдерживание раствора лизоцима в указанных выше условиях в течение 5-7 суток приводит к образованию амилоидных структур [11, 12]. Используемая концентрация лизоцима – 1,34 мМ. В инкубационную среду добавляли 0,02% азид натрия для устранения бактериального загрязнения. Контроль за процессом образования амилоидов из лизоцима осуществлялся ежедневно посредством измерения интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ( $\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/485$  нм). Концентрацию полученных амилоидных фибрилл оценивали по модифицированному методу Лоури. Полученные амилоидные фибриллы ресуспензировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,155 М NaCl.

Для создания модельной системы “амилоидные структуры–белки плазмы крови” к буферным растворам САБ и САЧ в различных концентрациях добавляли 50 мкл полученных из лизоцима куриного яйца амилоидных фибрилл (конечная концентрация белка 0,01 мг/мл) и смесь инкубировали 3 ч, 37°C при постоянном перемешивании.

Для оценки параметров люминесценции тиофлавина Т буферные растворы САЧ и САБ до и после их инкубации с амилоидными структурами, инкубировали с водным раствором тиофлавина Т (конечная концентрация составляла 10 мкМ) в течение 10 мин при  $t=20\pm 2^\circ\text{C}$ . Люминесцентные измерения проводили при  $\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/485$  нм.

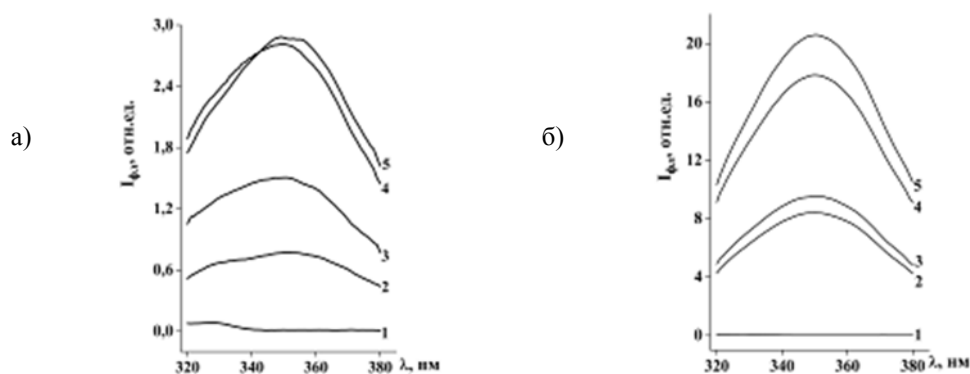
Спектры собственной флуоресценции буферных растворов САЧ и САБ до и после инкубации с амилоидными структурами регистрировали в ультрафиолетовой области спектра 320-380 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 296$  нм) и видимой области спектра 400-500 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм).

Все люминесцентные измерения выполнены на спектрофлуориметре SM2203 (“СОЛАР”, Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре «Спекорд М40» (Германия).

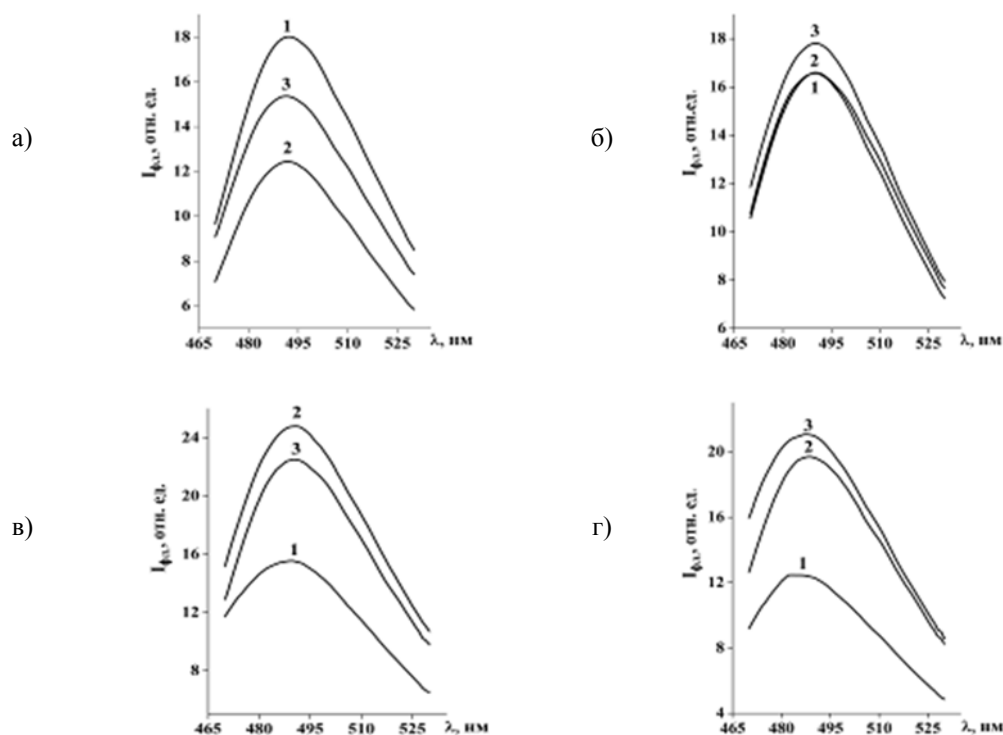
Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью создания модельной тест-системы “амилоидные структуры–белки крови” были изучены параметры собственной флуоресценции белков плазмы крови (САЧ и САБ) и зондовой флуоресценции в нативном состоянии и при взаимодействии их с амилоидными структурами. Как видно из рисунка 1, в зависимости от концентрации САЧ и САБ в забуференном растворе NaCl pH 7,4 (от 0,2 мг/мл до 1,5 мг/мл) наблюдается рост интенсивности триптофановой флуоресценции. Однако, если интенсивность собственной флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 296$  нм) САБ увеличивается в 4-5 раз при повышении его концентрации в растворе, то рост данного параметра флуоресценции для САЧ составляет порядка 100-200%, что объясняется отличием количества триптофанилов в белковых глобулах САЧ и САБ (рис. 1 а, б). При проведении сравнительного анализа между интенсивностью собственной флуоресценции САЧ и САБ и их концентрацией в растворе установлено, что использование САЧ и САБ в концентрации 1 мг/мл является наиболее подходящим для изучения взаимодействия альбуминов с амилоидными структурами.



**Рисунок 1.** Зависимость спектров собственной флуоресценции раствора САЧ (а)/САБ (б) от концентраций белка (1 – 0 мг/мл; 2 – 0,2 мг/мл; 3 – 0,5 мг/мл; 4 – 1,0 мг/мл; 5 – 1,5 мг/мл)

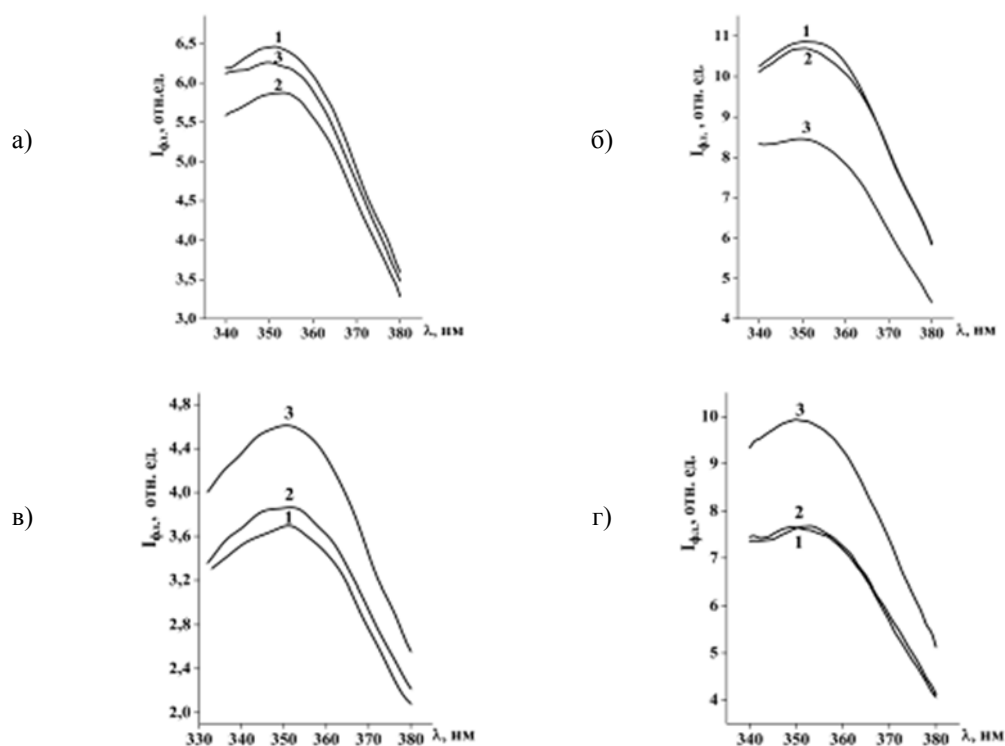


**Рисунок 2.** Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в модельную систему “белковая глобула САЧ (а, в) / САБ (б, г) + амилоидные структуры” в зависимости от температуры (а, б) (1 – 20°C; 2 – 37°C; 3 – 65°C) и pH среды инкубации (в, г) (1 – 5,4; 2 – 7,0; 3 – 8,0)

Как известно, процессы формирования комплексов амилоидных фибрилл с различными белками *in vitro* характеризуются разной скоростью. Она зависит от состава раствора, температуры, pH среды и др. Поэтому была проведена оценка собственной флуоресценции белков ( $\lambda_{\text{возб/рег}} = 296/350$  nm) и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ( $\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/495$  nm) в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” при различных условиях их инкубации: температура:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $65^\circ\text{C}$  и буферные системы с pH 5,4; 7,0 и 8,0. Тиофлавин Т является подходящим зондом для обнаружения амилоидных структур как *in vivo*, так и *in vitro*. Это обусловлено тем, что свободный краситель в водном растворе имеет низкий квантовый выход, а при взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл его квантовый выход возрастает на несколько порядков [13, 14]. Как видно из рисунков 2а и 2б, инкубация САЧ с амилоидными фибриллами при  $37^\circ\text{C}$  сопровождается снижением интенсивности флуоресценции ThT в среднем на 30-35 % по сравнению с выдерживанием при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Повышение температуры инкубации комплекса “САЧ–амилоидные фибриллы” до  $65^\circ\text{C}$  сопровождается также снижением интенсивности флуоресценции тиофлавина Т по сравнению с инкубацией при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , но в меньшей степени (в среднем на 15–20%) (рис. 2а). Однако увеличение температуры инкубации другого комплекса “САБ–амилоидные фибриллы” до  $65^\circ\text{C}$  сопровождается ростом интенсивности флуоресценции тиофлавина Т по сравнению с инкубацией при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  в среднем на 10%, на фоне отсутствия видимых различий в интенсивностях флуоресценции красителя при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  и  $37^\circ\text{C}$  (рисунок 2б).

Параллельно с оценкой интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” были изучены параметры собственной флуоресценции белков плазмы крови. Как видно из рисунков 3а и 3б, 3-часовая инкубация САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима при  $37^\circ\text{C}$  приводит к двукратному увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции исследуемого комплекса в случае использования САЧ, но к снижению изучаемого параметра в случае САБ примерно в 1,5 раза по сравнению со значениями интенсивности флуоресценции нативных растворов САЧ и САБ. В то же время установлено, что повышение температуры инкубации альбуминов с амилоидными фибриллами до  $65^\circ\text{C}$  сопровождалось разнонаправленными изменениями параметров собственной флуоресценции белков. Так, в случае комплекса “САЧ–амилоидные структуры” нами зарегистрировано повышение значения исследуемого параметра в среднем на 5-10 %, а в случае САБ – снижение на 20%.

При изучении влияния pH среды инкубации на образование комплексов амилоидов с белками крови обнаружено, что 3-часовая инкубация ( $37^\circ\text{C}$ ) САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима в условиях щелочной среды (pH 8,0) приводит к увеличению интенсивности триптофановой люминесценции комплекса “амилоидные структуры–белки плазмы крови” в среднем на 30% для САБ и на 15% для САЧ по сравнению с инкубацией в кислой (pH 5,4) и нейтральной (pH 7,0) средах (рис. 4в и 4г). Стоит отметить, что изменение концентрации ионов водорода в буферном растворе (10 mM натрий фосфатный буфер), используемом для разведения САБ и САЧ, а также амилоидных фибрилл, существенно не влияет на интенсивность триптофановой



**Рисунок 3.** Спектры триптофановой флуоресценции буферных растворов САЧ (а, в) / САБ (б, г) в комплексе с амилоидными структурами в зависимости от температуры инкубации (а, б) (1 – 20°C; 2 – 37°C; 3 – 65°C) и pH среды инкубации (в, г) (1 – 5,4; 2 – 7,0; 3 – 8,0)

флуоресценции белков. Установлено, что при инкубации белков плазмы крови с амилоидными фибриллами в условиях кислого значения pH интенсивность флуоресценции тиреофлавина Т находилась на низком уровне, то в условиях нейтральной и щелочной pH – возрастала примерно в 1,5 раза для САБ и в 2 раза для САЧ (рис. 2в и 2г).

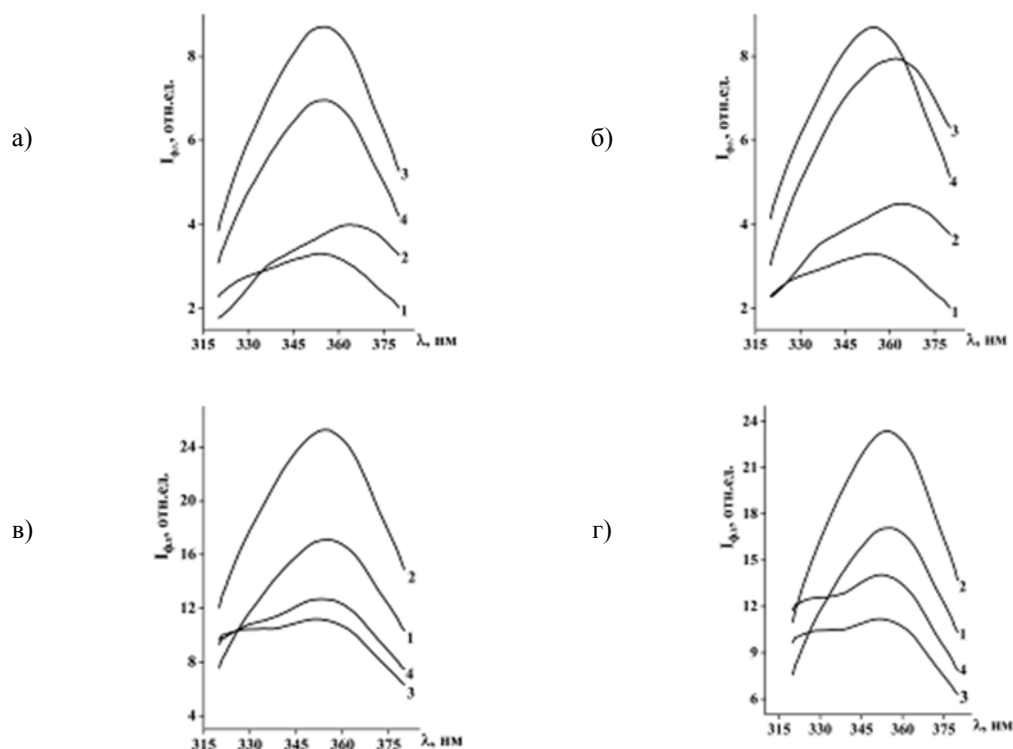
Полученные результаты позволяют заключить, что образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови” зависит от температуры инкубации, так как связь между белками и их лигандами обычно ослабевает при высоких температурах. С другой стороны, установлено, что значение pH среды инкубации также влияет на образование комплексов амилоидов с САЧ и САБ (снижается в области pH 5,4), что может явиться результатом изменения связывающей способности альбуминов при их окислении.

В связи с широким распространением заболеваний, связанных с отложением амилоидных фибрилл, большой интерес представляют соединения, способные подавлять агрегацию амилоидных белков, тем самым, защищая клетки от их токсического действия. Одними из таких перспективных соединений являются металлы.

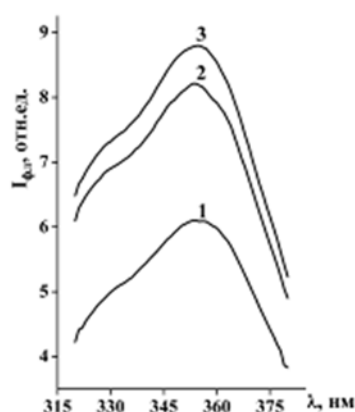
Существуют данные, свидетельствующие о том, что ионный состав среды оказывает влияние на образование и токсичность амилоидных структур. Например, было показано, что цинк и медь снижают способность  $\beta$ -амилоидного белка образовывать  $\beta$ -агрегаты, что усиливает защитные свойства клеток от токсичности, вызванной амилоидными структурами [15]. При этом цинк сильнее подавляет агрегацию  $\beta$ -амилоидного белка и способен защитить клетки от вызванного амилоидными структурами окислительного стресса [16]. Другие исследования показали, что добавление катионов металлов, таких как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  способствует образованию вторичной структуры  $\alpha$ -синуклеина и значительно ускоряет образование фибрилл [17]. Также в некоторых исследованиях установлена связь дисбаланса содержания ионов меди и цинка в клетках мозга с развитием болезни Альцгеймера [18]. В экспериментах, выполненных на культурах клеток, было показано, что медь может ускорять гибель клеток при сочетанном действии с амилоидными белками, вызывая окислительный стресс и усиливая токсичность амилоидных структур.

Исходя из вышеизложенного, на следующем этапе исследования было изучено влияние эссенциальных микроэлементов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  на образование комплекса амилоидных структур с белками плазмы крови. В качестве источников ионов меди (II) и цинка (II) были использованы соли соответствующих элементов:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{ZnCl}_2$ .

Как видно из рисунка 4, 3-часовая инкубация (37°C) растворов САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима в присутствии  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  в конечной концентрации в инкубационной среде 100 мкМ и 20 мкМ, соответственно, приводит к увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции комплекса “амилоидные структуры-альбумины” в среднем на 10–20 % в случае САБ и снижению на 15–25% в случае САЧ, по сравнению с комплексом “амилоидные фибриллы-САБ / САЧ”. Более того, стоит отметить, что добавление  $\text{Cu}^{2+}$  в инкубационную среду САЧ (рис. 4б), приводит к сдвигу максимума флуоресценции в длинноволновую



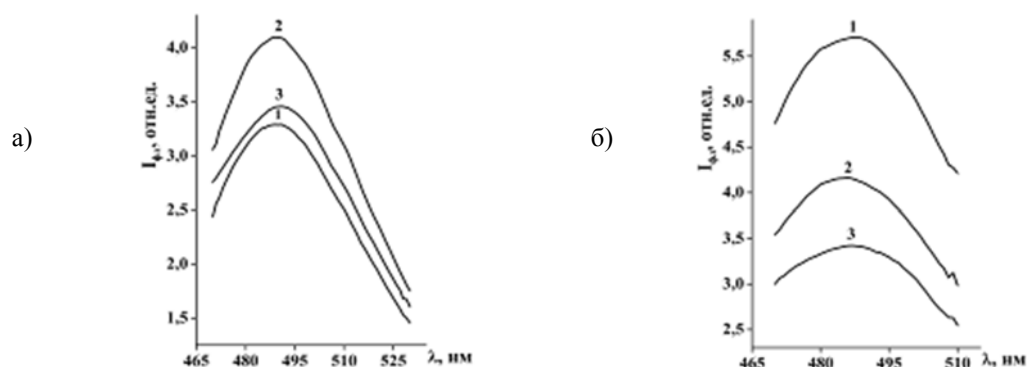
**Рисунок 4.** Спектры триптофановой флуоресценции буферных растворов САЧ (а, в) / САБ (б, г) в комплексе с амилоидными структурами (Ам) и ионами цинка (а, в) и меди (б, г) (1 – САЧ /САБ; 2 – САЧ/САБ+Zn<sup>2+</sup>(Cu<sup>2+</sup>); 3 – САЧ/САБ+Ам; 4 – САЧ/САБ+Ам+Zn<sup>2+</sup>(Cu<sup>2+</sup>))



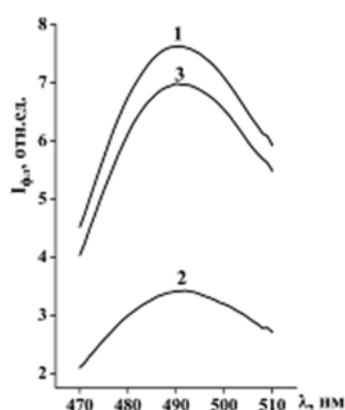
**Рисунок 5.** Спектры собственной флуоресценции комплексов “амилоидные структуры – Me<sup>n+</sup>” (1 – Ам; 2 – Ам+Zn<sup>2+</sup>; 3 – Ам+Cu<sup>2+</sup>)

область в среднем на 15-20 нм, а при образовании комплексов “амилоидные структуры-САБ/САЧ” и “амилоидные структуры-САБ/САЧ-Me<sup>n+</sup>” наблюдается появления второго пика в спектре люминесценции при  $\lambda = 320$  нм, который нетипичен для нативного раствора САБ/САЧ или САБ/САЧ+Me<sup>n+</sup> (рис. 4). Данный факт может служить флуоресцентным критерием обнаружения амилоидных фибрилл в плазме крови человека. При проведении сравнительного анализа интенсивности собственной флуоресценции растворов амилоидных фибрилл и амилоидных фибрилл проинкубированных с ионами исследуемых металлов мы наблюдаем четкую тенденцию к ее росту в 1,25-2 раза при взаимодействии с Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> (рис. 5).

Нами была проведена оценка интенсивности флуоресценции тирофлавина Т, встроенного в комплексы “амилоидные структуры-белки плазмы крови” до и после воздействия на них ионов исследуемых металлов. Как видно из рисунка 6, инкубация САБ и САЧ с амилоидными фибриллами в присутствии Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> приводит к 2-кратному снижению интенсивности флуоресценции ТtT в случае САБ и к противоположному эффекту (увеличению исследуемого параметра) в случае САЧ. При этом тирофлавин Т, встроенный в водные растворы САБ/САЧ или в комплексы САБ/САЧ с Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, не флуоресцирует (рис. 6а и 6б).



**Рисунок 6.** Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в комплексы “САЧ – амилоидные структуры –  $\text{Me}^{n+}$ ” (а) и “САБ – амилоидные структуры –  $\text{Me}^{n+}$ ” (б) (1 – САЧ/САБ+ThT; 2 – САЧ/САБ+ $\text{Cu}^{2+}$ +ThT; 3 – САЧ/САБ+ $\text{Zn}^{2+}$ +ThT)



**Рисунок 7.** Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в комплекс “амилоидные структуры– $\text{Me}^{n+}$ ” (1 – Ам; 2 – Ам+ $\text{Zn}^{2+}$ ; 3 – Ам+ $\text{Cu}^{2+}$ )

При проведении сравнительного анализа интенсивности флуоресценции ThT, встроенного в амилоидные фибриллы из лизоцима и в комплексы “амилоидные фибриллы –  $\text{Me}^{n+}$ ”, мы наблюдали четкую тенденцию к ее снижению в среднем в 3 раза при комплексообразовании с  $\text{Zn}^{2+}$ , в то время как комплексообразование с  $\text{Cu}^{2+}$  приводило к 20% ингибированию интенсивности флуоресценции ThT (рис. 7).

Таким образом, полученные результаты подтверждает литературные данные о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах именно для  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ . Более того, продемонстрировано, что ионы исследуемых эссенциальных микроэлементов, связываясь с  $\beta$ -амилоидами могут модулировать процессы их агрегации и, соответственно, клеточную токсичность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены параметры флуоресценции специфического зонда на амилоидные структуры тиофлавина Т и собственной флуоресценции белков плазмы крови (сывороточного альбумина человека (САЧ) и сывороточного альбумина быка (САБ)) в буферной системе до и после их взаимодействия с амилоидными структурами. Подобраны экспериментальные условия (соотношение концентраций белков плазмы крови и амилоидных фибрилл, температура, время взаимодействия белков с амилоидными структурами) для создания модельной тест-системы “амилоидные структуры-белки крови”.

2. Изучено влияние температуры и pH среды инкубации на образование комплексов амилоидов с белками крови. Для этого была оценена интенсивность флуоресценции зонда тиофлавина Т в комплексах САЧ / САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима при различных температурных условиях их инкубации (20°C, 37°C, 65°C) и различных значениях pH среды (5,4; 7,0; 8,0). Установлено, что образование комплекса “амилоидные структуры-белки крови” зависит от температуры инкубации, так как связи между белками и их лигандами обычно ослабевают при повышенных температурах. С другой стороны, установлено, что изменение pH среды инкубации в кислую область также сказывается на образовании комплексов САБ / САЧ с амилоидами, что может явиться результатом изменения связывающей способности альбуминов при их окислении. Показано, что изменение pH среды инкубации в щелочную область также сказывается на образовании комплексов САБ / САЧ с амилоидными структурами.

3. Проведена оценка параметров собственной флуоресценции белков в комплексах САЧ / САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима при различных температурных условиях их инкубации (20°C, 37°C, 65°C) и при различных pH буферных систем (5,4; 7,0 и 8,0). Показано, что параметры собственной флуоресценции белков в системах “амилоидные структуры–белки плазмы крови” зависят от типа белков, входящих в систему, а также от температуры и pH среды инкубации.

4. Изучено влияние эссенциальных ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) микроэлементов на образование комплексов амилоидных структур с белками плазмы крови. Для этого были оценены параметры собственной флуоресценции белков в комплексах САЧ и САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима, а также интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в данную систему и установлено, что исследуемые микроэлементы, внесенные в инкубационную среду, существенно изменяют параметры флуоресценции исследуемых образцов. Полученные результаты подтверждают предположение о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах для эссенциальных микроэлементов, которые, связываясь с  $\beta$ -амилоидами, вероятно, модулируют процессы их агрегации.

*Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант № M15-112.*

#### **Список литературы / References:**

1. Lansbury P.T. Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, no. 7, DOI: 10.1073/pnas.96.7.3342.
2. Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, vol. 169, no. 2, DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.12.008.
3. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, vol. 2. DOI: 10.1038/35081564.
4. Batarseh Y.S., Duong Q.-V., Mousa Y.M., Al Rihani S.B., Elfakhri K., Kaddoumi A. Amyloid- $\beta$  and astrocytes interplay in amyloid- $\beta$  related disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 3. DOI: 10.3390/ijms17030338.
5. Louw C., Gordon A., Johnston N., Mollatt C., Bradley G., Whiteley C.G. Arginine deiminases: therapeutic tools in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2007, vol. 22, no. 1. DOI: 10.1080/14756360600990829.
6. Довидченко Н.В., Леонова Е.И., Галзичкая О.В. Механизмы образования амилоидных фибрилл. *Успехи биологической химии*, 2014, т. 54, с. 203-230. [Dovidchenko N.V., Leonova E.I., Galzickaya O.V. Mechanisms of amyloid fibrils formation. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 2014, vol. 54, pp. 203-230. (In Russ)]
7. Dobson C.M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2001, vol. 356. DOI: 10.1098/rstb.2000.0758.
8. Радько С.П., Хмелева С.А., Супрун Е.В., Козин С.А., Бодоев Н.В., Макаров А.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. Физико-химические методы исследования агрегации  $\beta$ -амилоида. *Биомедицинская химия*, 2015, т. 61, вып. 2, с. 258-274. [Radko S.P., Khmeleva S.A., Suprun E.V., Kozin S.A., Bodoev N.V., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Physico-chemical methods for studying amyloid- $\beta$  aggregation. *Biochemistry, Supplemental Series B*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 258-274. (In Russ)]
9. Huang B., He J., Ren J., Yan X.Y., Zeng C.M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross – linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 25. DOI: 10.1021/bi900219c.
10. Malisauskas M., Ostman J., Darinskas A., Zamotin V., Liutkevicius E., Lundgren E., Morozova-Roche L.A. Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 8. DOI: 10.1074/jbc.M407273200.
11. Лукьяненко Л.М., Зубрицкая Г.П., Венская Е.И., Скоробогатова А.С., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов. *Новости медико-биологических наук*, 2013, т. 7, № 1, с. 9-13. [Lukyanenko L.M., Zubritskaja G.P., Venskaya E.I., Skarabahatava A.S., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Effect of amyloids on the physico-chemical state of the lipid bilayer of human erythrocytes. *News of biomedical sciences*, 2013, vol. 7, no. 1, p. 9-12. (In Russ)]
12. Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Венская Е.И., Слобожанина Е.И. Индуцированная амилоидами модификация мембран эритроцитов человека. Влияние антиоксидантов. *Доклады НАН Беларуси*, 2014, № 4, с. 78-81. [Zubritskaja G.P., Lukyanenko L.M., Venskaya E.I., Slobozhanina E.I. Modification of human erythrocyte membranes induced by amyloids. *Doklady Natsional'noi Akademii nauk Belarusi*, 2014, no. 4, pp. 78-81. (In Russ.)]
13. Krebs M.R., Bromley E.N., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *Structural Biology*, 2005, vol. 149, no. 1. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.08.002.
14. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*, 2012, vol. 45. DOI: 10.1021/ar300053p.
15. Duce J., Bush A. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 2010, vol. 92, no. 1. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.003.
16. Tõugu V., Tiiman A., Palumaa P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics*, 2011, vol. 3, no. 3. DOI: 10.1039/c0mt00073f.

17. Greenwald J., Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 2010, vol. 18, no. 10. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009.
18. Lau T.L., Ambroggio E.E., Tew D.J., Cappai R., Masters C.L., Fidelio G.D., Barnham K.J., Separovic F. Amyloid- $\beta$  peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 356, no. 3. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.091.

#### SPECTRAL AND LUMINESCENCE CHARACTERISTICS OF THE AMYLOID STRUCTURES COMPLEXES WITH BLOOD PROTEINS

**Harmaza Y.M., Zubritskaya H.P., Slobozhanina E.I.**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus  
*Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru*

**Abstract.** Analysis of the fluorescence parameters of thioflavin T, which is specific for the amyloid fibrils detection, and the parameters of the intrinsic fluorescence of blood proteins allowed to establish that the formation of the complex "amyloid structures – serum proteins" depends on the incubation temperature because of the bonds between proteins and their ligands become weaker under elevated temperatures. It was demonstrated that alteration of the incubation medium pH, both to the acidic and alkaline region, also affects on the formation of the complexes of serum albumin with amyloid structures, apparently as a result of the albumins binding ability changing during their oxidation. It was found that essential (Zn, Cu) trace elements interacting with the complex "amyloid structures – serum proteins" lead to modification of parameters as an intrinsic fluorescence as a fluorescent probe, that confirms the assumption about existence of the metal-binding sites in amyloid fibrils for metal ions.

**Key words:** amyloid structures, blood proteins, spectral characteristics, physical and chemical factors.