

Литература

1. Teale F.W.J. // Biochim. Biophys. Acta. – 1959. – Vol. 35. – P. 543
2. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. // Приборы и методы измерений. – 2011. – № 1(2). – С. 25-31.
3. Lepeshkevich S.V., Parkhats M.V., Stasheuski A.S., Britikov V.V., Jarnikova E.S., Usanov S.A., Dzhagarov B.M. // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118, № 10. – P. 1864-1878.

ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ

**Лозникова С.Ж.¹, Суходола А.А.², Тихомиров С.А.²,
Milowska K.³, Majoral J.-P.⁴**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

³*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland*

⁴*Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France*

Быстрое развитие нанотехнологий привело к появлению нового раздела в медицине – наномедицины. Применение наноматериалов для лечения требует детального изучения их влияния на биологические структуры. Дендримеры класс полимеров, имеющий структурные преимущества перед вирусными и невирусными системами (векторами) доставки генетического материала в больные органы и ткани. При внутривенном способе введения дендримеров возможно их неспецифическое взаимодействие с белками и клетками крови, тканями стенок сосудов. Поэтому исследование механизмов взаимодействия дендримеров с регуляторными белками плазмы крови является актуальной задачей современной нанобиофизики и медицины.

В настоящее время остается недостаточно изученным характер взаимодействия дендримеров с белками. Понимание механизмов их взаимодействия является необходимым условием использования наноматериалов в медицине. В настоящей работе в качестве объектов исследования нами выбраны ферментативные белки – щелочная фосфатаза (ЩФ), тромбин, лактат-дегидрогеназа (ЛДГ) и аспартат трансаминаза (АСТ). Исследовалось взаимодействие белков с фосфорными (ФД) и полиами-

доаминными (ПАМАМ) дендримерами 3-его и 4-ого поколений. В данной работе проведен анализ биосовместимости дендримеров с целью их использования в качестве эффективных и безопасных переносчиков генетического материала для лечения рака.

Методика эксперимента.

В работе использованы тромбин человека (Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, МЗ РБ), ЩФ (Sigma-Aldrich Chemical Company, США), ЛДГ (Sigma-Aldrich Chemical Company, США) и АСТ (ERM, Sigma-Aldrich Chemical Company, США). Растворы белков, кроме ЩФ, готовили в 10 мМ фосфатно-буферном растворе, pH 7,4. Для ЩФ использовали буфер по Кларку-Лабсу, pH 8,0 [1]. Измерения кинетики триптофановой флуоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) в микросекундном диапазоне проводили на автоматизированном лазерном спектрометре, созданном в Институте физики им. Степанова НАН Беларуси [2]. В качестве возбуждающего излучения использовали импульсы $\lambda=290$ нм. Удаление кислорода из образцов осуществляли с помощью сульфита натрия (20 мМ) в течение 15 мин при 20 °С. Коммерческие дендримеры ПАМАМ G3, G4 были получены из Sigma-Aldrich Chemical Company (США). ФД были синтезированы в Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS [3].

Результаты и обсуждение.

Исследовано взаимодействие между ферментативными белками и катионными ПАМАМ и фосфорными дендримерами 3-его и 4-ого поколений методом ТФКТ в микросекундном диапазоне.

Показано, что добавление дендримеров к растворам белков приводило к частичному тушению микросекундной ТФКТ всех исследованных белков. Значения времен жизни ТФКТ белков значительно снижаются при взаимодействии с ФД и ПАМАМ дендримерами 3-его и 4-ого поколений. Полученные результаты свидетельствуют об эффекте динамического тушения ТФКТ белков при комплексообразовании с дендримерами при молярном соотношении 6:1 (дендример:белок), что является следствием усиления частоты и амплитуды внутримолекулярной подвижности структуры белков и сопровождается частичным разворачиванием белков.

Таким образом, при образовании комплексов белка с дендримерами происходит увеличение внутримолекулярной подвижности компонентов структуры белка. При этом, формирование комплексов белка с дендримерами приводит к экспонированию дендримером поверхностных триптофанилов белка в водное окружение.

Интересно, что максимальный эффект наблюдался в случае ТФКТ щелочной фосфатазы, белка, имеющего аномально жесткий центр. При этом время жизни ТФКТ белка существенно снижалось при добавлении дендримеров в молярном соотношении 6:1 (дендример:белок). Схожие изменения наблюдались для обоих типов дендримеров двух генераций.

Для фосфорных дендримеров наблюдался более выраженный эффект, чем для ПАМAM дендримеров. Данные можно объяснить следующим образом. Времена жизни ТФКТ белков сильно зависят от удаления кислорода [4-6]. Сильное взаимодействие дендримеров с поверхностью белка может ограничить эффективное удаление кислорода из белковой глобулы [4-6], что приводит к существенному уменьшению ТФКТ.

Полученные результаты позволяют предполагать значительный вклад жесткости структуры белковых макромолекул в их взаимодействие с наноструктурами.

This work was partially supported by the National Science Centre of Poland, Project No. DEC-2012/04/M/NZ1/00059 and by a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE. Также работа поддержана грантом БРФФИ № Б15МС-001 «Индукцируемые наноматериалами изменения структурно-динамического состояния щелочной фосфатазы, тромбина, лактат-дегидрогеназы и аспарат трансминазы»

Литература

1. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – Москва: Мир, 1999. – 543 с.
2. Борисевич Н.А., Суходола А.А., Толсторожев Г.Б. Природа длительной люминесценции N-метилиндола и индола в газовой фазе // Журн. прикл. спектр. – 2007 – Vol. 74, № 3. – Р. 341-345.
3. Phosphorus-containing dendrimers. From material science to biology / J.P. Majoral, A.M. et al // Heteroatom Chem. – 2002. – Vol. 13. – Р. 474–485.
4. Saviotti M.L., Galley W.C. Room temperature phosphorescence and the dynamic aspects of protein structure // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1974. – Vol. 71, № 10. – Р. 4154 – 4158.
5. О конформационной чувствительности параметров триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре белков мембран и клеток / В.М. Мажуль и др. // Весці АН БССР. Сер. Біял. Навук. – 1976. – № 6. – С. 52 – 56.

6. Мажуль В.М., Ермолаев Ю.С., Конев С.В. Триптофановая флуоресценция при комнатной температуре – новый метод изучения структурного состояния биологических мембран и белков в клетке // ЖПС. – 1980. – Т. 32, Вып. 5. – С. 903 – 907.

СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРОВ НА ОСНОВЕ НОВЫХ СТИРИЛОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Луговский А.А.¹, Самцов М.П.¹, Луговский А.П.¹,
Лавыш А.В.², Маскевич А.А.², Кузнецова И.М.³, Туроверов К.К.³

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

² Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

³ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, РФ

В настоящее время однозначно показано, что болезнь Альцгеймера и ряд других прогрессирующих нейродегенеративных расстройств связаны со спонтанной пространственной перестройкой определённого белка (специфичного для каждого заболевания) и его последующей полимеризацией с образованием амилоидных фибрилл (АФ) с молекулярной массой в несколько миллионов дальтон, вызывающих дегенерацию нейронов [1]. Обнаружение АФ в различных тканях является актуальной задачей для разработки эффективной диагностики данных заболеваний на ранних стадиях. В качестве флуоресцентного зонда для изучения АФ широко используется бензотиазоловый краситель тиофлавин Т (ThT), образующий интенсивно флуоресцирующий в сине-зеленой области (450–500 нм) комплекс. Однако использование ThT в опытах *in vivo* осложняется тем, что в этой спектральной области биологические ткани обладают значительным собственным поглощением и флуоресценцией.

Нами был синтезирован ряд производных ThT, обладающих длинноволновым поглощением и флуоресценцией и являющихся перспективными в качестве флуоресцентных красителей для детекции и изучения структуры фибрилл и протофибрилл. Выполнены измерения спектров поглощения и флуоресценции синтезированных соединений в растворителях различной полярности. Максимумы спектров поглощения красителей смещаются в длинноволновую область с ростом длины полиметиновой цепочки. Так максимум поглощения соединения (1) в изопропанолe находится на длине волны 421 нм, для монокарбостирилового соедине-