Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова НИИ физико-химической биологии им. АН. Белозерского

На правах рукописи

Сорокина Светлана Анатольевна

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ С АМИЛОИДОГЕННЫМ БЕЛКОМ

02.00.06 - Высокомолекулярные соединения

03.01.04 - Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научные руководители: доктор химических наук, доцент Шифрина З.Б. доктор биологических наук, профессор Муронец В.И.

Москва – 2019

содержание

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	
1.1 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ СИНТЕЗА ДЕНДРИМЕРНЫХ	МОЛЕКУЛ 10
1.2 СВОЙСТВА ДЕНДРИМЕРОВ	
1.3 КЛАССЫ ДЕНДРИМЕРОВ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИС ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ	СЛЕДУЕМЫЕ 14
1.3.1 Полиамидоаминные дендримеры	
1.3.2 Полипропилениминовые дендримеры	
1.3.3 Фосфорсодержащие дендримеры	
1.3.4 Полилизиновые дендримеры	
1.3.5 Карбосилановые дендримеры	
1.3.6 Гибридные дендримеры	
1.4 БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕНДРИМЕРОВ	
1.4.1 Токсичность	
1.4.2 Проницаемость гемато-энцефалического барьера д	ля дендримеров30
1.5 КОМПЛЕКСЫ ДЕНДРИМЕРОВ С БЕЛКАМИ	
1.5.1 Природа взаимодействия дендримеров с белками	
1.5.2 Влияние различных факторов на взаимодействие д белками	ендримеров с 36
1.5.3 Влияние дендримеров на вторичную структуру, ко внутримолекулярную подвижность	энформацию и 38
1.5.4 Метод молекулярной динамики и моделирование (дендримерных взаимодействий	белок- 39
1.6 ДЕНДРИМЕРЫ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБС	ОЛЕВАНИЯ 42
1.6.1 Молекулярные механизмы развития нейродегенера заболеваний	ативных 42
1.6.2 Прионный белок	
1.5.3 Способы воздействия на процесс амилоидной агре	гации белков 50

2.5.4 Определение концентрации высвободившегося белка методом	
иммуноферментного анализа	. 122
2.5.5 Флуоресценция тиофлавина Т	. 124
2.5.6 Флуоресцентная микроскопия	. 126
2.6 ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ДЕНДРИМЕРОВ	. 129
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	. 131
3.1 РЕАГЕНТЫ И РАСТВОРИТЕЛИ	. 131
3.2 СИНТЕЗ ИСХОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	. 132
3.3 СИНТЕЗ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ	. 134
3.4 СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ	
ДЕНДРИМЕРОВ	. 140
3.5 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОВЕЧЬЕГО	140
ПРИОННОГО БЕЛКА	. 142
3.6 ФОРМИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕЖДУ ДЕНДРИМЕРАМИ И НАТИВНЫМ ОВЕЧЬИМ ПРИОННЫМ БЕЛКОМ	l 143
3.7 ИНГИБИРОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ПРИОННОГО БЕЛКА	144
3.8 РАЗРУШЕНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ	144
3.9 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	145
ВЫВОДЫ	159
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	. 161
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	162
БЛАГОДАРНОСТИ	. 163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	. 164

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В течение двух последних десятилетий усилия ученых в области дендримерной химии сосредоточены на возможностях практического использования дендритных макромолекул. Наибольший интерес вызывает биологическое применение дендримеров, 0 чем свидетельствует большое количество публикаций [1-8]. Возможности биологического применения дендримеров обусловлены особенностями из строения, а именно точно регулируемыми нанометровыми размерами макромолекул, большим числом функциональных групп на поверхности и возможностью их модификации, наличием полостей, способностью формировать комплексы «гость-хозяин», а также монодисперсностью макромолекул, достигаемой за счет поэтапного синтеза [9]. Все эти особенности дендримеров обеспечивают возможность направленного изменения структуры и придания необходимого комплекса свойств в зависимости от поставленной задачи. Так, дендримеры могут быть использованы в качестве векторов для доставки генетического материала [3], лекарственных 11]. направленных носителей средств [10, новых противовирусных [2, 12] и антибактериальных [2], противовоспалительных [5] и анти-амилоидных агентов [4].

Вместе тем, биологических свойств с исследование новых макромолекулярных объектов должно включать изучение фундаментальных принципов их взаимодействия с биологическими объектами, в частности, с белками. Белки выполняют важнейшие функции в организме, включая ферментативную, транспортную, строительную, регуляторную, они входят в состав крови и пр. Однако, структурная конверсия белков и связанное с ней формирование амилоидных фибрилл у человека ведут к развитию нейродегенеративных заболеваний, многие из которых в настоящий момент не имеют эффективных способов лечения [13, 14].

Спектр таких заболеваний включает в себя болезни Альцгеймера [15], Паркинсона [16], прионные заболевания, вызывающие различные типы энцефалопатии (коровье бешенство, скрепи, губчатой куру, болезнь Кройцфельда-Якобса) [17] и др [13]. Таким образом, существует насущная потребность в проведении исследований по уменьшению цитотоксического эффекта амилоидов и небольших агрегатов, образующихся на пути к их формированию, и поиске путей ингибирования амилоидной агрегации белков. Определенные успехи в этом направлении были достигнуты с низкомолекулярных химических соединений использованием [18]. В частности производных фенола [19-22], коричной кислоты [23] и др. Однако, использование низкомолекулярных соединений не всегда достаточно эффективно, ввиду непрочного связывания с белком, и требует применения больших концентраций веществ. В отличие 0 низкомолекулярных соединений полимеры обеспечивают эффективное связывание и способны амилоидную агрегацию белков, а также подавлять разрушать уже сформировавшиеся агрегаты [24, 25]. Однако, полидисперсность синтетических полимеров затрудняет исследование образующихся белокполимерных комплексов из-за их неоднородности и затрудняет однозначное интерпретирование полученных результатов.

По этим причинам, в качестве основного объекта исследований в данной работе были выбраны дендримеры, которые, с одной стороны, обладают всеми полезными свойствами традиционных полимеров, а с другой стороны. являясь индивидуальными соединениями, имеют строго определенную молекулярную массу, размер и форму в растворе [26, 27]. Высокая стабильность образующихся с белками комплексов обеспечивается большим числом поверхностных функциональных групп, а монодисперсность дендримеров позволяет получать однозначные И воспроизводимые результаты. При этом стоит отметить, что использованные в работе катионные пиридилфениленовые дендримеры характеризуются

постоянством заряда и жесткостью структуры. Вместе эти свойства обеспечивают неизменность взаимодействия дендримеров с белками при любых условиях среды и делают данный тип дендримеров удобными модельными соединениями для выявления особенностей их взаимодействия с амилоидогенными белками.

Таким образом, **целью настоящей работы** является изучение взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком - рекомбинантным овечьим прионом – и выявление потенциальной способности указанных дендримеров влиять на амилоидную агрегацию белков.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

- синтез и характеризация катионных пиридилфениленовых дендримеров трех генераций;
- исследование взаимодействия дендримеров с нативным белком; выявление движущей силы и механизма взаимодействия, потенциальных сайтов связывания, изучение влияния строения дендримера на комплексообразование с белком;
- изучение способности дендримеров препятствовать белковой агрегации, а также предотвращать структурную конверсию приона на пути к образованию наиболее токсичных амилоидных форм – олигомеров белка;
- выявление возможности разрушения белковых агрегатов амилоидной природы с помощью катионных пиридилфениленовых дендримеров;
- изучение цитотоксичности дендримеров.

<u>Научная новизна работы</u>. В работе впервые проведено комплексное изучение взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным прионным белком. Установлен механизм образования стабильных комплексов. Экспериментально доказана принципиальная возможность использования пиридилфениленовых дендримеров как для

предотвращения белковой агрегации, так и для разрушения уже сформировавших агрегатов. Показано, что токсичность дендримеров ниже наиболее часто используемых поли(амидоаминных) и поли(этилениминовых) дендримеров.

<u>Практическая ценность работы</u> заключается в возможности использования полученных фундаментальных закономерностей комплексообразования катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком для дальнейшего исследования и разработки новых лекарственных средств.

Личный вклад автора состоит в участии в постановке задач исследования, разработке подходов к их решению, непосредственном выполнении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, формулировании выводов И подготовке публикаций. Исследования, описанные в диссертации, выполнены автором лично или совместно с сотрудниками НИИ физико-химической биологии им. АН. Белозерского и Несмеянова института элементоорганических соединений ИМ. A.H. Российской академии наук.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных и Всероссийских конференциях и симпозиумах: Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014» (Москва, 2014); Международной химической конференции для молодых ученых «ChemCYS 2014» (Бланкенберг, Бельгия, 2014); Четвертом международном симпозиуме, посвященном биологическому применению дендримеров «Biodendrimer 2014» (Лугано, Швейцария, 2014), конференции «Химия Элементоорганических Соединений и Полимеров 2014» (Москва, 2014), Пятой Всероссийской с международным участием конференции и «Макромолекулярные нанообъекты и школе для молодых ученых (Московская область. 2015). <u>11-й</u> полимерные нанокомпозиты» Международной конференции «Биокатализ-2017» (Москва, 2017),

Международной конференции «<u>Modern trends in dendrimer chemistry and</u> applications» (Москва, 2017), Конгрессе «FEBS 2018» (Прага, Чехия, 2018).

Публикации. Основное содержание работы опубликовано в 12 научных работах, в том числе 4 статьях в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 8 тезисах в сборниках докладов научных конференций.

<u>Структура и объем работы.</u> Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, 6 глав обсуждения результатов, экспериментальную часть, выводы, и список цитируемой литературы (249 наименований), содержит 54 рисунка и 6 таблиц. Общий объем составляет 193 страницы.

Работа выполнена в лаборатории Макромолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), а также в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НИИ ФХБ МГУ).

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ СИНТЕЗА ДЕНДРИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ

Слово «дендример», впервые предложенное D. A. Tomalia [28], состоит из двух греческих слов: *dendros* (дерево) и *meros* (часть) и отражает их химическую структуру, состоящую из повторяющихся блоков – мономерных звеньев, - растущих от центрального фрагмента (Рисунок 1). Благодаря такой структуре, а также высокой молекулярной массе, дендримеры принято относить к полимерным системам, однако, несмотря на это, они являются индивидуальными соединениями, поскольку методы их получения принципиально отличаются от способов синтеза традиционных полимеров.

Синтез дендримеров осуществляют поэтапно, при этом на каждом этапе соединение выделяется, очищается и характеризуется. Существует два подхода к построению дендримерной молекулы. Первый, и наиболее часто используемый метод, – дивергентный – был предложен группой F. Vogtle [29]. В этом случае рост молекулы осуществляется от центра к периферии (Рисунок 1, А). На первом этапе к мультифункциональному ядру, содержащему от двух до шести активных функциональных групп, присоединяется х (х равняется количеству функциональных групп ядра) молекул разветвляющего мономера с получением первой генерации дендримера. Мономеры, как правило, представляют собой AB₂, реже AB₃, соединения, в которых один тип функциональных групп активен в реакции присоединения, а другой остается защищенным заместителями. Таким образом, следующий этап заключается в снятии защиты с концевых групп дендримера первой генерации, приводящем к появлению новых групп, способных к дальнейшему росту молекулы. Каждый этап реакции

присоединения приводит к дендримеру большего поколения. Повторение реакций роста и активации позволяет получить дендримеры высоких поколений. На любом из этапов поверхность дендримера может быть легко изменена или модифицирована.

Второй метод синтеза – конвергентный – был разработан в группе М. J.Frechet [30]. В этом случае на первом этапе осуществляется синтез отдельных ветвей дендримера – дендронов – за счет повторяющихся последовательностей реакций присоединения и активации «строительных блоков», описанных ранее (Рисунок 1, Б). На заключающем этапе проводят присоединение синтезированных дендронов к мультифункциональному ядру. Таким образом, рост молекулы осуществляется от периферии к центру. В случае конвергентного синтеза для построения дендримерной молекулы требуется провести меньшее количество реакций, ПО сравнению С дивергентным. Однако, модифицировать дендример можно ЛИШЬ на последнем этапе, кроме того, ввиду стерических затруднений, невозможно осуществить синтез высоких генераций.



Рисунок 1 – Схематическое изображение структуры дендримера, а также двух путей синтеза дендримерных молекул: дивергентного (А) и

конвергентного (Б)

1.2 СВОЙСТВА ДЕНДРИМЕРОВ

Несмотря на то, что дендримеры относят к полимерным соединениям, они обладают рядом важных свойств, отличающих их от традиционных полимеров и обуславливающих их детальное изучение в качестве потенциальных новых биологических агентов.

Поэтапный синтез дендримеров позволяет эффективно контролировать и изменять заданным образом молекулярный вес, размер, форму, полярность, плотность поверхностных групп, гибкость молекулы и распределение функциональных групп за счет использования различных строительных блоков.

Благодаря контролируемому синтезу, а также очистке соединений на каждом этапе, дендримеры, в отличие от традиционных полимеров, представляют собой практически монодисперсные соединения с индексом полидисперсности Mw/Mn<1.01-1.05. Монодисперсность дендримеров была доказана с использованием методов высокоэффективной много раз жидкостной и гель проникающей хроматографии, масс-спектрометрии, гель электрофореза, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) [26, 31]. Стоит, однако, отметить, что при переходе к дендримерам высоких генераций, возможно возникновение структурных дефектов молекулы, обусловленное неполным замещением групп в результате стерических препятствий, внутримолекулярной циклизации, либо формирования димеров [27, 32]. Однако и в этом случае индекс полидисперсности не превышает 1.05.

Дендримеры обладают нанометровыми размерами, при этом размер молекулы закономерно растет с ростом генерации. Так, диаметр молекул полиамидоаминных (ПАМАМ) дендримеров увеличивается от 1.1 нм для дендримера первойгенерации до 12.4 нм для дендримера десятой генерации [26]. Форма молекулы также может изменяться с ростом генерации.

Например, ПАМАМ дендримеры низких генераций (1-3) имеют эллипсоидную форму, в то время как форма молекул дендримеров высоких генераций близка к сферической.

Дендримеры обладают прекрасной растворимостью, что облегчает их характеризацию. Присутствие таких функциональных групп, как карбоксильные, гидроксильные, аминные на периферии молекулы улучшает растворимость в полярных растворителях, а благодаря сферической форме для дендримеров высоких генераций достигается не только большое число функциональных терминальных групп, но также и их большая плотность.

Наличие внутренних полостей в дендримерном скелете позволяет инкапсулировать небольшие молекулы, например, лекарственные средства, с образованием комплексов «хозяин-гость» [33]. Присутствие функциональных групп на периферии молекулы открывает широкие возможности для их направленной модификации с целью придания определенных свойств, а также конъюгации с различными молекулами для улучшения направленности действия перспективных лекарственных средств дендримеров. Так, конъюгирование на основе дендримеров С моноклональными антителами [34] значительно улучшает специфичность взаимодействия с целевым белком, а связывание с фолиевой кислотой – направленность доставки к опухолевым клеткам [35, 36]. Функциональные группы обуславливают заряд дендримера, и, следовательно, возможность взаимодействия с биологическими молекулами посредством электростатических сил. Кроме того, описано формирование различных комплексных структур за счет гидрофобных сил, водородных связей, Вандер-Ваальсовых взаимодействий. Так, дендримеры способны формировать прочные комплексы с нуклеиновыми кислотами и белками [3].

Большая плотность периферийных функциональных групп, достигаемая благодаря сферической форме дендримеров высоких генераций, дает дополнительные преимущества дендримерам, в частности, при

изученииих анти-амилоидных свойств [37], что будет рассмотерно более детально в главе «Анти-амилоидные свойства дендримеров».

Стоит также отметить, что конформация дендримеров в растворе зависит не только от номера генерации, но и от условий среды. Так, было показано, что форма дендримеров может изменяться в зависимости от концентрации соли и значения pH [38-41]. Это особенно актуально для гибких аминосодержащих дендримеров, чьи цепи способны сворачиваться, а степень протонирования зависит от pH [37-39].

1.3 КЛАССЫ ДЕНДРИМЕРОВ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИССЛЕДУЕМЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

1.3.1 Полиамидоаминные дендримеры

Полиамидоаминные дендримеры впервые синтезированы D. A. Tomalia в 1985 г [42]. Синтез ПАМАМ дендримеров (Рисунок 2) осуществляют дивергентным методом. На первом этапе происходит присоединение по Михаэлю трех молекул метилакрилата к одной молекуле аммиака. Следующий этап – амидирование с использованием избытка этилендиамина, позволяющее получить дендример первого поколения с концевыми аминогруппами, способными в дальнейшем снова вступать в реакцию Михаэля.



Рисунок 2 - Синтез полиамидоаминных дендримеров

В то время как «полная» генерация ПАМАМ дендримера содержит аминогруппы на периферии молекулы и несет положительный заряд, "половинные" генерации ПАМАМ дендримеров являются полианионами с терминальными карбоксильными группами [43]. Замена терминальных аминогрупп на гидроксильные позволяет получать нейтральные молекулы.

ПАМАМ дендримеры нашли широкое применение в различных областях, в том числе в биомедицине. Их терминальные группы могут быть модифицированы заданным образом, чтобы придать необходимый комплекс новых свойств в зависимости от поставленной задачи. Одним из наиболее часто встречающихся вариантов модификации является введение остатков поли(этиленгликоля) (ПЭГ) на периферию молекулы, позволяющее снизить Так, конъюгация с цитотоксичность дендримеров. ПЭГ приводит к уменьшению разрушения митохондриальных мембран, ведущему к апоптозу клеток, сравнению с немодифицированными дендримерами [44]. ПО Исследования по доставке генетического материала с помощью ПАМАМ дендримера пятой генерации показали, что ацетилирование также приводит к снижению токсичности. Данные были получены на клеточных линиях

глиомы, при этом эффективность трансфекции по сравнению с немодифицированными дендримерами не менялась [45]. В другой работе [46] было обнаружено, что присоединение фолиевой кислоты к терминальным группам ПАМАМ дендримеров ведет к селективному эндоцитозу молекул опухолевыми клетками, благодаря наличию на их поверхности рецептора к фолиевой кислоте. Недавно на основе таких конъюгатов была разработана система по доставке терапевтических антисмысловых олигонуклеотидов к клеткам глиомы [47].

Работы последних лет прекрасно демонстрируют преимущества дендритной структуры, позволяющей сочетать в себе, с одной стороны, направленную модификацию поверхностных групп, как для снижения токсичности, так и для связывания с рецептор-специфическими векторами, с другой, сохраняя возможности для переноса лекарственных веществ, доставки генетического материала или проявления собственных терапевтических свойств дендримерами [3, 35, 48, 49]. Так, в работе [35] авторы показали, что система на основе ПАМАМ дендримера третьей генерации, модифицированного ПЭГ, фолиевой кислотой, ацетатными молекулы группами, a также содержащего цианина В качестве флуоресцирующих меток, селективно накапливалась в местах воспаления, что было продемонстрировано на клеточных линиях. Такая система обладала высоким сродством к молекулам активированных макрофагов, активно экспрессирующих рецепторы к фолиевой кислоте в очагах воспалений.

1.3.2 Полипропилениминовые дендримеры

Наряду с ПАМАМ дендримерами, полипропилениминовые (ППИ) дендримеры являются коммерчески доступными и представляют собой еще один класс дендримеров, имеющий перспективы применения в биомедицине.

В основе синтеза ППИ дендримеров лежит повторяющаяся последовательность реакций присоединения по Михаэлю и восстановления нитрильных групп (Рисунок 3). Синтез начинается с взаимодействия диаминобутана с избытком акрилонитрила, приводящего к получению нитрильного производного, каталитическое восстановление которого позволяет получить первичные аминогруппы, способные к дальнейшему росту цепи.

Как и в случае ПАМАМ дендримеров модификация концевых групп ППИ дендримеров позволяет снизить их токсичность, повысить селективность взаимодействия с целевыми белками и органеллами, улучшить кинетику высвобождения лекарственных веществ в случае их инкапсуляции в дендример. Например, введение галактозных остатков на периферию молекулы позволило осуществить направленную доставку лекарственного средства к клеткам гепатоцитов [50]; а модификация фолиевой кислотой увеличивала селективность доставки к раковым клеткам, ввиду наличия большого количества рецепторов к фолиевой кислоте на их поверхности[36].

Модифицированные мальтозными и мальтотриозными группами ППИ дендримеры также являются перспективными кандидатами для доставки противоопухолевых лекарственных средств [51, 52], а комплексы сульфонированных и карбоксилированных ППИ дендримеров с ионами двухвалентных металлов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} проявляли активность против вируса иммунодефицита [53].



Рисунок 3 - Синтезполипропилениминовых дендримеров

1.3.3 Фосфорсодержащие дендримеры

Отсутствие токсичности фосфор-содержащих дендримеров сделали их перспективными соединениями для биологического применения. Первый синтез такихдендримеров было описан в 1990 г [54], однако наибольшее применение нашли фосфорсодержащие дендримеры, синтезированные А. М. Caminade и J. P. Majoral [55-57].

Синтез может начинаться с три-, либо шестифункционального центра и основан на применении двух реакций с использованием 4гидроксибензальдегида и $H_2NNMeP(X)Cl_2$ (X = O, либо S) в качестве разветвляющих фрагментов (Рисунок 4). В качестве побочных продуктов на обоих этапах выделяются только H₂O и NaCl, а все реакции протекают с количественным выходом. При использовании три-функционального центра были получены дендримеры вплоть до 12 поколения, что является своего рекордом дендримеров. При рода В химии использовании циклотрифосфазена – шестифункционального центра- удалось получить бездефектные молекулы до 8 генерации [58].



Рисунок 4 – Синтез фосфорсодержащих дендримеров

Данный класс дендримеров был исследован качестве В трансфецирующих [59] и антиамилоидных агентов [60], а также как соединения, обладающие активностью против вируса иммунодефицита человека [61]. Дендримеры были также протестированы *in vivo* как носители лекарственных средств [62], в качестве флуоресцирующих меток для визуализации опухолей [63]. Большое количество исследований посвящено изучению противовоспалительной активности фосфоросодержащих дендримеров, в том числе возможности их применения для лечения ревматоидного артрита [64-66]. Стоит выделить работу М. Hayder [64], в которой авторы продемонстрировали, что внутривенное введение в течение 12 недель аза-бисфосфорного дендримера, содержащего 24 периферийные группы, в мышей, больных ревматоидным артритом, снижало уровень провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, уменьшало разрушение хрящевой, а также эрозию костной ткани. При этом токсического эффекта дендримера не наблюдалось.

1.3.4 Полилизиновые дендримеры

Полилизиновые дендримеры построены из повторяющихся остатков аминокислоты лизина и могут быть подразделены на дендримеры, несущие пептидные группы на периферии, пептидные дендримеры, чья структура целиком состоит из молекул аминокислот, а также дендримеры, сочетающие полилизиновый скелет и различные периферийные группы. Полилизиновые дендримеры биосовместимы и биодеградируемы, что обусловило большое количество исследований, посвященных их биологическому применению.

Синтез полилизинового дендримера впервые был осуществлен в группе R. G. Denkewalter в 1981 г [67]. В основе синтеза лежит повторяющаяся последовательность реакций роста и активации с использованием N,N'бис(терт-бутоксикарбонил)-L-лизин нитрофенильного эфира в качестве реагента и бензгидриламина в качестве ядра (Рисунок 5). Таким образом, были получены дендримеры до десятого поколения.

Перспективным способом модификации таких дендримеров оказалось введение гликозидных остатков. Так, модификация остатками сиаловой кислоты позволила получить полилизиновый дендример с карбогидратной периферией, проявляющий противовирусную активность [68].



Рисунок 5 – Синтез полилизиновых дендримеров

Самым успешным примером применения дендримеров в медицине является полилизиновый дендример, модифицированный нафталиндисульфоновой кислотой (Рисунок 6). Данный дендример является активным веществом лекарственного средства VivaGel, разработанного компанией Starpharma, Мельбурн, Австралия. Средство активно против вирусов иммунодефицита, герпеса, бактериальной инфекции [69, 70]. В настоящий момент данное лекарственное средство проходит третью фазу клинических испытаний [71].



Рисунок 6 – Структура активного вещества лекарственного средства VivaGel

1.3.5 Карбосилановые дендримеры

Отличительной особенностью карбосилановых дендримеров является наличие атома кремния в точках ветвления дендримера. Карбосилановые дендримеры синтезируют на основе реакций алкилирования реактивом Гриньяра и гидросилилирования (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Синтез поликарбосилановых дендримеров

Низкая полярность Si-C связи обуславливает гидрофобный характер молекулы в целом, однако, модификация концевых групп гидрофильными заместителями улучшает растворимость в водных растворах, а также придает различные биологические свойства. Так, модификация терминальных групп различными гликозидными остатками, комплементарными рецепторам, находящимся на поверхности вирусного капсида, делает карбосилановые перспективными противовирусными [72, 73]. дендримеры агентами Дендримеры с концевыми аммонийными или аминогруппами способны взаимодействовать малой интерферирующей РНК с с получением эффективных систем трансфекции [74, 75], а также способны ингибировать агрегацию амилоидогенного белка альфа-синуклеина [76].

1.3.6 Гибридные дендримеры

В последнее время исследования ученых в области дендримерной химии сосредоточены на разработке новых подходов к синтезу дендримеров, наиболее быстро позволяющих получать разветвленные молекулы, сочетающие В себе функциональные блоки различной природы С максимально возможным числом ветвлений. Это позволяет рационализировать синтез дендримеров и снизить их стоимость, а также дает новые возможности для конструирования молекул с требуемыми свойствами. Стратегия интересна и для медицинских исследований, так как сочетание различных по своей природе структурных единиц позволяет синтезировать молекулы с принципиально новым набором свойств.

Подобный подход, названный «onion peel», впервые был предложен группой R. Roy и позволил дивергентным путем получить гликодендримеры с использованием различных строительных блоков на каждой генерации [77-80]. Для формирования гетерогенных слоев использовали протекающие с высоким выходом реакции этерификации тиоленов и тиолинов, а также азид-"click" алкин химии. Полученные таким способом дендримеры принципиально отличаются OT получаемых традиционным методом дендримерных молекул, построенных из повторяющихся на каждом этапе одинаковых строительных блоков.

Другим интересным примером «onion peel» стратегии является синтез карбосилановых-виологен-фосфорных дендримеров, основанный на конвергентном синтезе с использованием реакций двойного алкилирования 4,4'-бипиридина двумя различными галогенирующими агентами с

последующим присоединением к гексафункциональному фосфорному ядру полученных дендронов через реакцию конденсации аминогрупп с альдегидами [81]. Такой синтез позволил объединить в одной молекуле разнообразие свойств трех различных строительных блоков, а именно липофильность карбосиланового скелета, полярность N, N'-дизамещенного-4, 4'-дипиридила (виологена) и жесткость фосфорсодержащего ядра (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Структура гибридного карбосилан-виологен-фосфорного дендримера

В работе также проведено исследование взаимодействия таких гибридных дендримеров с белками плазмы крови. Так, дендримеры взаимодействовали с человеческим сывороточным альбумином за счет электростатических сил, не изменяя его вторичной структуры вплоть до пятикратного молярного избытка дендримера по отношению к белку. МТТ тест, проведенный на линии клеток фибробластов, показал, что обработка клеток дендримером, содержащим 12 терминальных групп, в концентрации 5 µМ снижала выживаемость клеток до 80 %. В то время как при использовании дендримера с 24 концевыми группами аналогичное снижение выживаемости достигалось уже в концентрации 0,1 µМ. Все исследованные дендримеры не вызывали гемолиз эритроцитов в диапозоне 0,01-0,1 µМ.

Другим впечатляющим примером гибридных дендримеров является синтез фуллеренсодержащих гликодендримеров, изображенных на рисунке 9, проявляющих активность против вируса Эбола [82, 83]. Как показали исследования [84-86], благодаря своей глобулярной структуре фуллерены являются удобной платформой для мультивалентного введения углеводных остатков и могут быть использованы для мультивалентного ковалентного связывания других биоактивных молекул.

В продолжение этих работ, с использованием CuAAC "click" химии были получены тридекафуллерены, в которых центральный [60] фуллерен ковалентно связан с двенадцатью [60] фуллеренами, каждый из которых остатков (Рисунок 9) [82]. несет десять углеводных Биологические проведенные клеточных линиях, показали, испытания, на что синтезированные молекулы способны селективно взаимодействовать с DC-SIGN рецепторами, вовлеченными в процесс проникновения вирусных частиц в клетку.



Рисунок 9 - Синтез фуллеренсодержащих гликодендримеров

Такое взаимодействие блокировало распространение вирусной инфекции, однако, ингибирующий эффект зависел от типа углеводного остатка на поверхности дендримерной молекулы. Так, соединение 2 (Рисунок 9), содержащее 120 остатков галактозы, не проявляло противовирусной активности, в то время как соединения 1 и 3, несущие такое же количество маннозы, проявляли выраженный противовирусный эффект уже в пико- и наномолярных концентрациях.

1.4 БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕНДРИМЕРОВ

1.4.1 Токсичность

Одно из главных условий, которым должны удовлетворять дендримеры для обеспечения возможности их применения в биомедицине, - отсутствие

токсичности и иммуногенности. На сегодняшний день имеется большое количество исследований, посвященных изучению как *in vitro*, так и *in vivo* токсичности различных классов дендримеров [6]. Цитотоксичность дендримеров зависит как от их химического состава, размера, концентрации, так и от типа используемых клеточных линий, состава клеточной среды, времени экспозиции.

Наиболее часто используемый метод ДЛЯ оценки токсичности дендримеров *in vitro*— выживаемость клеток на основе МТТ анализа. Метод основан на способности митохондриальных И цитоплазматических живых метаболически активных дегидрогеназ клеток восстанавливать бесцветный водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Нтетразолиум бромид (MTT) в формазан, который кристаллизуется внутри клеток. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органических растворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), с последующим контролем методом спектрофотометрии. Восстановление клетками тетразолия показывает метаболическую активность дегидрогеназ и является адекватным показателем жизнеспособности клеток в культуре, что позволяет оценить специфическую гибель клеток, вызванную тем или иным цитотоксическим агентом [87].

Как и другие поликатионные соединения, дендримеры могут оказывать цитотоксический эффект, который растет с ростом генерации [88, 89]. Однако, как показало исследование Fischer [89], ПАМАМ дендримеры демонстрировали меньшую токсичность по сравнению с аналогичным линейным полимером. При этом катионные ПАМАМ и ППИ дендримеры оказывают приблизительно одинаковый цитотоксический эффект [90, 91].

В настоящее время считается, что немодифицированные ПАМАМ и ППИ обладают слишком высокой токсичностью для парентерального введения. Модификация терминальных групп дендримера – перспективный

способ снижения системной токсичности дендримеров. Так, модифицирование терминальных групп ПАМАМ дендримеров ПЭГ привело к изменению ЛД₅₀ до 1 мМ против 0,13 мМ концентрации исходного дендримера для линии клеток Сасо-2 [92]. Подобная зависимость была обнаружена и в других работах [93-95]. Введение ПЭГ в структуру ППИ дендримеров также снижало их токсичность [96, 97]. Перспективным методом снижения токсичности является также кватернизация азота [98, 99]. Конъюгация дендримеров с дексаметазоном [100], фенилаланином [101], порфирином [102], аргинином [103, 104], этерефикация поверхностных групп [105], а также скелета [106] вели к снижению токсичности.

Сравнительный анализ (концевые токсичности катионных аминогруппы) и анионных (концевые карбоксильные группы) дендримеров показал значительно меньшую токсичность анионных соединений [88]. Более того. низкие генерации ПАМАМ дендримеров с карбоксильными терминальными цитотоксического, группами не оказывали ΗИ ΗИ гематотоксического эффекта вплоть до концентрации 0,35 мМ [91].

Цитотоксичность дендримеров зависит не только от характера поверхностных функциональных групп, но и от природы атомов во внутренней сфере дендримера. Например, дендримеры, состоящие из ароматического полиэфирного ядра и поверхностных карбоксильных групп, вызывали гемолиз клеток крови мышей спустя 24 ч [91].

МТТ тест считается наиболее чувствительным методом анализа [107], однако различные факторы, например, склеивание клеток в культуре, изменение pH, концентрации альбумина, исчерпывание необходимых нутриентов могут снижать скорость восстановления МТТ в формазан и приводить к ошибочным результатам [108].

Стоит отметить, что проведение МТТ теста не вносит ясности в механизм цитотоксического действия дендримеров. Это всегда сложный процесс, включающий в себя совместное действие различных факторов и для

его прояснения необходимо учитывать процессы проникновения и транспорта дендримера в клетку, его локализацию, влияние дендримеров на целостность мембраны, клеточные метаболиты, окислительновосстановительный гомеостаз и т.д. [109-111].

Так, проникновение дендримеров в клетку и их дальнейшая локализация зависят от природы их функциональных групп. Анионные дендримеры интернализуются по пути кавеолинзависимого эндоцитоза, нейтральные и катионные - посредством клатрин- кавеолин-независимого эндоцитоза [112] и макропиноцитоза [113]. Дальнейшая локализация дендримера в клетке также зависит от заряда. Анионные дендримеры инкапсулируются эндосомами и затем лизосомами [114], в то время как катионные локализуются в митохондриях [115, 116].

Молекулярные механизмы цитотоксического действия дендримеров в высоких концентрациях заключаются в повреждении митохондриальной мембраны, что приводит к появлению активных форм кислорода, вызывающих окислительный стресс и повреждение ДНК, нарушению действия митоходриальной цепи переноса электрона процессов И окислительного фосфорилирования, либо ингибировании активности оксидазы цитохрома С, снижении синтеза НАДФ(Н) [109-111, 116, 117].

Вместе с тем, токсичность дендримеров *in vivo* отличается от данных по токсичности *in vitro*. Эффект сильно зависит от количества препарата, а введения, способа его природы дендримера [6]. Так, также фосфорсодержащие, анионные и нейтральные дендримеры считаются нетоксичными [1, 118, 119]. ПАМАМ дендримеры вплоть до седьмой генерации в невысокой концентрации (5*10⁻⁵ мМ/кг веса) не оказывали токсического действия на мышей даже при длительном введении (до 6 месяцев) [120]. Однако увеличение концентрации до 0.5 мМ/кг веса привело к значительному росту токсичности [121]. Низкие генерации катионных

дендримеров также оказывают меньшее токсическое воздействие по сравнению с высокими [122].

1.4.2 Проницаемость гемато-энцефалического барьера для дендримеров

Лечение многих заболеваний центральной нервной системы осложняется наличием гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). ГЭБ представляет собой плотной слой эндотелиальных клеток с размером пор менее 1 нм, отделяющий нервную ткань от кровяного русла, и селективно пропускающий только необходимые питательные и биоактивные вещества.

Как правило, пассивный транспорт лекарственных веществ возможен для соединений с молекулярной массой не более 400 Да и формирующих не более 7 водородных связей, либо с суммой атомов азота и кислорода в молекуле, не превышающей 5 [123]. Однако, исследования последних лет частицы нанометрового размера, показали, что различные включая липосомы, полимерные наночастицы, липидные микро- и наночастицы, полимерные наногели и полимерные мицеллы способны проникать сквозь ГЭБ [4, 124]. Один из предположительных механизмов проникновения – рецептор-опосредованный эндоцитоз. В частности, некоторые коммерческие технологии, например, «Троянский конь», используют специфические эндогенные лиганды для связывания с рецепторами на поверхности клеток капилляров [123, 125].

В ряде исследований было показано, что дендримеры способны проходить сквозь ГЭБ, предположительно, посредством абсорбциоопосредованного эндоцитоза [4, 10, 126, 127]. Так, в работе [10] было показано, что ПАМАМ дендримеры, модифицированные ПЭГ, связанные с трансферритином и несущие доксорубицин во внутренних полостях, активно проходили через ГЭБ, доставляя 13,5% доксорубицина за 2 ч, по сравнению с

5% в случае свободного доксорубицина. Размер конъюгата при этом варьировался в пределах 14 – 20 нм. В общем случае считается, что молекулы с размером до 20 нм могут проходить через ГЭБ. Значение имеет также способ введения вещества. Так, многие лекарства могут попадать в мозг, если введены интраназально [4, 127]. Следует также отметить, что нарушение ГЭБ, характерное для ряда нейродегенеративных заболеваний, облегчает проникновение лекарственных веществ из крови в нервные тканий.

1.5 КОМПЛЕКСЫ ДЕНДРИМЕРОВ С БЕЛКАМИ

Белки выполняют большое количество важных функций в жизнедеятельности клетки и организма. Они обеспечивают транспорт определенных веществ через клеточную мембрану, выступают в роли структурных единиц, являются рецепторами. Ни одна биохимическая реакция в организме не протекает без участия белков-ферментов. Введение лекарственных веществ неразрывно связано с их взаимодействием с кровью, плазма которой содержит > 2 400 молекул белков [128, 129]. Количество же белковых молекул в спинномозговой жидкости превышает 2 600 единиц [130].

Поэтому исследование биологических свойств различных классов дендримеров включает детальное изучение их взаимодействия с белками, выяснение движущей силы и механизма этого взаимодействия, влияния дендримеров на структуру белков, а также различных факторов, таких как рH, ионная сила среды, температура и др. на связывание.

1.5.1 Природа взаимодействия дендримеров с белками

Взаимодействие дендримеров с белками в общем случае обусловлено электростатическими взаимодействиями заряженных групп дендримеров с

аминокислотными остатками белка. Однако другие типы взаимодействий также вовлечены в связывание, например гидрофобные взаимодействия, водородные связи, вандерваальсовы силы. Природа взаимодействий дендримеров с белками была детально рассмотрена в ряде работ. Так, в работе [131] методом электронного парамагнитного резонанса было проанализировано взаимодействие 2й и 6й генераций ПАМАМ дендримеров с аминокислотами (Гли, Глу, Арг, Лей) и белками (α-химотрипсин, Эффективность взаимодействия альбумин). падала В ряду Лей≈Арг>Гли>Глу. В случае цвиттер-ионного лейцина, взаимодействие было обусловлено синергетическим эффектом электростатических сил между аминогруппами дендримера и карбоксильной группой Лей, и гидрофобных взаимодействий боковой цепи Лей с алифатическими участками дендримера. Для Глу было предложено формирование стабильных ионных пар с третичным азотом, расположенным во внутренней сфере дендримера. Сильная зависимость указанных взаимодействий от pH также подтверждала роль электростатических сил. Движущая сила взаимодействия дендримеров с α-химотрипсином имеет электростатическую природу, однако нужно принимать во внимание вклад в связывание и гидрофобных взаимодействий, благодаря наличию в структуре белка гидрофобного кармана [131].

Вклад различных типов взаимодействий в связывание дендримеров с белками во многом зависит от заряда дендримера и модификации его терминальных групп.

Так, движущей силой взаимодействия немодифицированных катионных и анионных дендримеров с белками являются электростатические взаимодействия (Таблица 1).

Таблица 1 – Взаимодействие дендримеров с белками

Белок	Дендример	Механизм взаимодействия	Ссылка
Бычий и	Катионные,	Основные силы:	[31, 32, 74,
человеческий	нейтральные	- электростатические взаимодействия между	80, 132-
сывороточный	и анионные	заряженными концевыми группами дендримера и	140]
альбумин	ПАМАМ	аминокислотными остатками белка,	-
5	дендримеры,	- водородные связи между группами,	
	карбосиланов	расположенными во внутренней сфере	
	ыедендример	дендримера, (например, амидные группы, в	
	ы	которых карбонильный О выступает в качестве	
		донора, а Н в качестве акцепотора) и	
		аминокислотными остатками белка,	
		- гидрофобные взаимодействия, возникающие	
		между неполярными сегментами молекул,	
		- специфические взаимодействия между	
		карбоксильными группами дендримера и сайтами	
		связывания алифатических кислот в белке.	
		Катионные дендримеры не оказывали	
		воздействия на вторичную структуру белка, в то	
		время как анионные приводили к ее изменению.	
		При этом наблюдались значительные изменения в	
		конформации и внутримолекулярной	
		подвижности белка. Всего в молекуле альбумина	
		расположено 5-6 неспецифических отрицательно	
		заряженных областей, способных связать	
		катионныедендримеры.	
Альфа-	Катионные	Во взаимодействие вовлечены как	[131, 141]
химотрипсин	ПАМАМ	электростатические (изоэлектрическая точка	
	дендримеры	белка 8.3), так и гидрофобные силы, благодаря	
	10	наличию гидрофобного кармана	[1.40]
Ацетилхолин-	Катионные,	Электростатические и гидрофооные	[142]
эстераза	неитральные	взаимодеиствия, при этом дендримеры оказывали	
	и анионные	влияние на вторичную структуру оелка	
	Дендримеры Дй гацарации		
Вибонцияторо	4и генерации Иотнорицио		[126]
Гиоонуклеаза	катионные,	ведущая роль принадлежит электростатическим	[130]
11, альдолаза,	нситральные	взаимоденствиям, которые осласевали с	
погеназа	ПАМАМ	увеличением ионной силы. Паолюдалиев	
азупин	ленлримеры	полвижности	
шелочная	5й генерации	nodbirkitoetti.	
фосфатаза	onrepuqui		
человеческий			
гамма-			
глобулин			
J -			
Инсулин,	ППИ	Взаимодействия электростатические, дендримеры	[143]
рибосомаль-	дендримеры	оказывали влияние на вторичную структуру и	
ный α/β	(немодифици	термическую стабильность белка, при этом	
протеин S6,	рованные,	эффект зависел от природы белка.	
кутиназа,	модифициро-		
лизоцим	ванныегуанид		
	ином/мочевин		

	ой),		
	катионные		
	ПАМАМ		
	дендримеры		
Коллаген	Катионные	Кросс-сшитый дендримерами коллаген	[144]
	ПАМАМ	демонстрировал более высокую температуру	
	дендримеры	денатурации и большую термическую	
		устойчивость по сравнению с	
		немодифицированным	
ЦитохромС	Анионные	Электростатическое взаимодействие без	[141]
	карбоксилиро	воздействия на вторичную структуру белка, при	
	ванные	этом дендример связывался с поверхностью белка	
	ПАМАМ		
	дендримеры		
Актин	Катионные	3 типа взаимодействий:	[145]
	поли(л-	- при низких концентрациях (0.01-1 мкг/мл)	
	лизиновые)	дендримеры выступали в качестве G-актин	
	дендримеры	связывающих белков,	
		- в концентрации 10 мкг/мл дендримеры	
		увеличивали скорость экспоненциальной фазы	
		полимеризации,	
		- в диапозоне 10-100 мкг/мл скорость	
		полимеризации увеличивалсь за счет сокращения	
		как экспоненциальной, так и лаг-фазы.	
Альфа-	Катионные	Обнаружено 2 типа воздействия дендримеров на	[146]
химотрипсино	ПАМАМ	белок:	
ген А	дендримеры	-улучшение конформационной стабильности,	
		- уменьшение белок-белковых взаимодействия за	
		счет окружения белка молекулами дендримера	
Алкоголь-	Немодифицир	Взаимодействие электростатическое, при этом	[147, 148]
дегидрогеназа,	ованные и	другие типы взаимодействий также вовлечены в	
лизоцим	модифициров	связывание: водородные связи, вандерваальсовы	
	анные	силы, гидрофобные. Дендримеры,	
	мальтозой	модифицированные мальтозными группами, не	
	ППИ	оказывали влияния на вторичную структуру	
	дендримеры	белка, в отличие от их немодифицированных	
	4й генерации	аналогов	
Аспартаттранс	Катионные	Движущей силой взаимодействия являются	[144, 149]
аминаза,	ПАМАМ	электростатические силы. Влияние дендримеров	
щелочная	дендримеры,	на вторичную структуру белка сильно зависело от	
фосфатаза, L-	фосфорные	его природы	
лактатдегидро-	дендримеры		
геназа			

Роль различных типов взаимодействий при связывании заряженных дендримеров с белками может быть расположена в следующем порядке:

- электростатические взаимодействия между заряженными концевыми группами дендримеров и аминокислотными остатками белка, - водородные связи между группами, расположенными во внутренней сфере дендримера, (например, амидные группы, в которых карбонильный О выступает в качестве донора, а Н в качестве акцептора) и аминокислотными остатками белка,

- гидрофобные взаимодействия, возникающие между неполярными сегментами молекул,

- специфические взаимодействия между карбоксильными группами дендримера и сайтами связывания алифатических кислот в белке [150].

Напротив, при связывании нейтральных ПАМАМ-ОН дендримеров основная роль принадлежит гидрофобным взаимодействиям [132]. Однако в общем случае, заряженные дендримеры гораздо эффективнее взаимодействуют с белками по сравнению с нейтральными.

Стоит отметить, что электростатические взаимодействия могут наблюдаться даже между одноименно заряженными дендримерами и белком. Это объясняется неоднородностью расположения заряда в белковой молекуле: обладая суммарно положительным зарядом, в белке сохраняются локальные участки отрицательно заряженных аминокислот, что открывает возможность для взаимодействия с поликатионами,и наоборот. Подобное поведение описано также и для взаимодействия одноименно заряженных белков и линейных полиэлектролитов [151-153].

Модифицирование концевых групп дендримеров оказывает значительное влияние на их взаимодействие с белками. В случае модификации поверхности заряженными группами, движущей силой ППИ остается электростатика. Модифицирование поверхности же нейтральными мальтозными дендримеров группами сохраняло ИХ взаимодействие с прионом, однако в данном случае связывание было обусловлено исключительно образованием водородных связей [37]. Модификация поверхности может как усиливать взаимодействие, так и ослаблять его. Например, введение гуанидиновых групп в состав ПАМАМ

дендримеров усиливало взаимодействие с прионом за счет увеличения числа заряженных групп дендримера [154]. Изменения в структуре дендримера также оказывают влияние и на воздействие дендримеров на вторичную структуру белков. Так, замещенные остатками сахаров ПАМАМ дендримеры третьей и пятой генераций не изменяли вторичной структуры альбумина, в то время как модифицированные ПЭГ катионные ПАМАМ дендримеры демонстрировали сильное связывание с альбумином, воздействуя на его вторичную структуру и конформацию [133, 134]. Влияние ППИ дендримеров на инсулин также зависело от природы концевых групп дендримера (немодифицированные, либо модифицированные гуанидином или мочевиной) [143]. Тем не менее, все дендримеры изменяли вторичную структуру и термическую стабильность белка. Таким образом, природа терминальных групп дендримера играет важную роль при их взаимодействии с белками.

1.5.2 Влияние различных факторов на взаимодействие дендримеров с белками

При исследовании взаимодействия дендримеров с белками во времени было обнаружено, что оно протекает в два этапа [155]. На первом этапе в период до 4,5 нс возникают электростатические взаимодействия. Остальные силы (гидрофобные, силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи) вовлекаются в связывание через ≈ 100 нс. Данные хорошо согласуются с результатами молекулярного моделирования взаимодействия дендримеров С лекарственными средствами, нуклеиновыми кислотами, белками И мембранами [156].

Взаимодействие гибких ПАМАМ и ППИ дендримеров с белками зависит от **рН и ионной силы**, что обусловлено природой заряженных групп
как дендримера, так и белка, чья ионизация зависит от внешних условий. Так, при pH>8,3 заряжены только терминальные первичные аминогруппы дендримера, а при pH<8,3 происходит частичное протонирование третичных аминогрупп, причем их протонирование завершается при pH<2 [157, 158].

Вследствие преимущественно электростатического типа взаимодействий, наиболее эффективное связывание происходит при максимальном заряде дендримера. Добавление соли (увеличение ионной силы раствора) снижает эффективность взаимодействия и может привести даже к разрушению комплекса. Это обусловлено, с одной стороны, общим свойством электростатических взаимодействий ослабевать с увеличением ионной силы, с другой стороны, уплотнением белковой молекулы, увеличением экранирования по механизму связывания противоион-полиион и эффектом Гофмейстера [132, 136].

Белковые кофакторы также оказывают влияние на взаимодействие с дендримерами. Так, жирные кислоты, являющиеся кофактором БСА, ослабляют взаимодействие с дендримерами [135]. При этом чем больше жирных кислот связано с белком, тем более выражен эффект. Присутствие двух или трех молекул жирных кислот приводило к их экстракции дендримером.

Концентрация дендримера существенно влияет на эффективность связывания с белком и его воздействие на белковую молекулу. Например, полимеризация актина сильно зависела от концентрации дендримера [145]. При низких концентрациях (0.01-1 µг/мл) дендримеры выступали в качестве G-актин связывающих белков, в концентрации 10 µг/мл дендримеры увеличивали скорость экспоненциальной фазы полимеризации, в диапазоне 10-100 µг /мл скорость полимеризации увеличивалась за счет сокращения как экспоненциальной, так и лаг-фазы [145]. Низкие концентрации дендримеров зачастую оказывают стабилизирующий эффект на белковую молекулу, например, 1,4 µг /мл ПАМАМ дендримеров третьей и четвертой генераций

стабилизируют инсулин и предотвращают его агрегацию [159], в то время как высокие концентрации, напротив, приводят к денатурации белка. Так, 450 µг /мл ППИ приводили к значительной потере термической устойчивости инсулина [143].

1.5.3 Влияние дендримеров на вторичную структуру, конформацию и внутримолекулярную подвижность

Связывание дендримеров с белком в большинстве случаев оказывает значительное влияние на вторичную структуру белка, его конформацию и подвижность. С одной внутримолекулярную стороны, связываясь С несколькими участками белка, дендример вызывает компактизацию белковой молекулы и ограничивает ее подвижность, с другой, может вызывать разворачивание структуры белка. Влияние дендримера зависит от его природы и заряда, а также в большей степени от гибкости белковой молекулы [144, 160, 161]. В зависимости от последнего, дендример способен либо не оказывать какого-либо заметного влияния на белок, или приводить к изменениям вторичной структуры, конформации И функциональной активности. К примеру, катионные ПАМАМ дендримеры третьей и четвертой генераций не воздействовали на щелочную фосфатазу, обладающую жесткой структурой, но оказывали сильное влияние на лактатдегидрогеназу и аспартаттрансаминазу [136, 144, 161].

Функциональная активность белка также в значительной степени дендримера И гибкости белковой зависит ОТ природы молекулы. Нейтральные ПАМАМ-ОН дендримеры четвертой и пятой генераций Na⁺/K⁺-зависимой и Ca²⁺-зависимой уменьшали активность АТФазы, ПАМАМ-ОН дендример пятой генерации, напротив, активировал Mg²⁺зависимую АТФазу [162]. Катионные ПАМАМ, фосфорсодержащие и

карбосилановые дендримеры оказывали существенно различный эффект на ферменты сыворотки крови (щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, аспартаттрансаминаза, холинэстераза, аланинаминотрансфераза, амилаза, креатин киназа и 2-гидроксибутират дегидрогеназа) [160]. В таблице 2 суммированы результаты исследований влияния дендримеров на ферментативную активность некоторых белков-ферментов.

Белок	Дендример	Эффект	Ссылка
Ацетилхолин-	Катионные,	Снижение ферментативной активности.	[142]
эстераза	нейтральные и		
	анионные ПАМАМ		
	дендримеры		
	четвертой генерации		
Человеческая	Гидроксилированные	Уменьшение ферментативной	[162]
эритроцитарная	ПАМАМ	активностиNa/К-зависимой и Са-зависимой	
АТФаза	дендримеры третьей,	АТФазы на 20-30%. Увеличение	
	четвертой и пятой	ферментативной активности Mg-	
	генераций	зависимойАТФазы	
Свиной пепсин	Катионные,	Катионные и нейтральные дендримеры	[162]
	нейтральные и	ингибировали ферментативную активность	
	анионные ПАМАМ	пепсин, взаимодействуя как с самим	
	дендримеры	пепсином, так и с фермент-субстратным	
	четвертой генерации	комплексом.	
Ферменты	Катионные ПАМАМ	Использованные ферменты: щелочная	[144,
сыворотки	дендримеры	фосфатаза, лактатдегидрогеназа, гамма	160]
крови человека	четвертой генерации,	глутамилтрансфераза, аспартаттрансаминаза,	
	фосфорные	холинэстераза, аланинаминотрансфераза,	
	дендримеры	амилаза, креатин киназа и 2-гидроксибутират	
	четвертой генерации	дегидрогеназа. Влияние дендримеров	
	и карбосилановые	оказывалось различным: ингибрование,	
	дендримеры третьей	активирование, либо отсутствие эффекта в	
	генерации	зависимости от используемого белка и его	
		природы.	

Таблица 2 – Влияние дендримеров на белки-ферменты и их активность

1.5.4 Метод молекулярной динамики и моделирование белокдендримерных взаимодействий

Молекулярное моделирование белок-дендримерных взаимодействий [163-165] позволяет предсказать структуру комплекса, сайты связывания

дендримеров с белком, определить их число, а также вклад разного типа взаимодействий в связывание.

Так в работе [150] методом молекулярной динамики было показано, что человеческий сывороточный альбумин взаимодействует не только с поверхностными аминогруппами ПАМАМ дендримеров, но и с протонами вторичных аминогрупп, расположенных во внутренней сфере дендримеров. Такое поведение может быть объяснено способностью цепей гибких дендримеров принимать различные конформации, открывая возможность для взаимодействия внутренних гидрофобных групп с белком. Исследование взаимодействия ПАМАМ дендримеров с альфа-химотрипсиногеном А выявило два важных эффекта: увеличение конформационной стабильности белка и уменьшение белок-белковых взаимодействий (ассоциации) за счет окружения белковой молекулы дендримерами [146].

В работах [166, 167] было изучено влияние противоионов дендримеров взаимодействия Для на эффективность ИХ с белком. было ЭТОГО проанализировано взаимодействие ПАМАМ дендримеров, модифицированных гуанидиновыми группами, с альфа-химотрипсиногеном. В качестве противоионов были выбраны Cl⁻, SO₄²⁻и H₂PO₄⁻. Мерой эффективности взаимодействия служил коэффициент предпочтительного взаимодействия G, который термодинамически связан со свободной энергией переноса белка из воды в водно-солевой раствор и может быть использован для оценки предпочтительности взаимодействия ионов соли с поверхностью белка. При концентрации 0,18 М значения коэффициента G для Cl⁻, SO₄²⁻и H₂PO₄⁻ оказались равными 1,0, 2,7 и 2,3, соответственно. Это означает, что анионы Cl⁻ способствуют взаимодействию дендримеров с белком, в то время какSO₄² и H₂PO₄, напротив, ингибируют связывание. В случае противоионов СГдендример связывался с белком за счет формирования водородных связей между гуанидиновой группой дендримера и отрицательно заряженными аминокислотами, также счет катионного-π взаимодействия a за С

ароматическими аминокислотами. Более того, согласно результатам моделирования, возможно одновременное кооперативное связывание нескольких гуанидиновых групп с поверхностью белка, что ведет к формированию более прочных связейдендримера с белком по сравнению со связыванием по одной функциональной группе (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Результаты молекулярного моделирования методом молекулярной взаимодействия ПАМАМ динамики модифицированных дендримеров, гуанидином, с альфа-химотрипсиногеном. Связывание дендримера белком С возможно сразу нескольким ПО поверхностным группам.

В другой работе [168] было показано, что частично гликозилированные дендримеры блокируют белок МД-2 (антиген лимфоцита) и предотвращают опосредованный комплексом ТЛР4-МД-2-липополисахарид цитокиновый ответ. Это происходит за счет кооперативного электростатического взаимодействия глюкозаминовых остатков дендримера с аминоксилотными остатками белка МД-2, расположенными рядом с гидрофобным карманом..

В работе [169] было проведено молекулярное моделирование взаимодействия сульфонированных карбосилановых дендримеров с тремя различными белками (бычий сывороточный альбумин, миоглобин, лизоцим). Было обнаружено, что, несмотря на отрицательный заряд, БСА все же формирует комплексы с одноименно заряженными дендримерами. Электростатическое взаимодействие оказывается возможным за счет локально расположенных положительно заряженных участков белка.

1.6 ДЕНДРИМЕРЫ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Способность дендримеров формировать комплексы с белками используется исследователями также и для выявления возможности их применения в качестве терапевтических агентов [2, 8, 170]. Так, дендримеры проявляют противовирусные, антибактериальные, противовоспалительные свойства [2, 5, 8].

Так как основная часть настоящего диссертационного исследования посвящена изучению взаимодействия дендримеров с амилоидогенным белком – прионом, - вовлеченным в развитие нейродегенеративных заболеваний, следующая часть литературного обзора будет сосредоточена на молекулярных механизмах развития заболеваний, амилоидной агрегации белков и способов воздействия на этот процесс, а также анализе имеющихся к настоящему моменту исследований в области анти-амилоидной активности дендримеров.

1.6.1 Молекулярные механизмы развития нейродегенеративных заболеваний

В настоящее время способность к формированию амилоидных структур считается естественным свойством большого количества белков [171]. Недавние исследования показали, что некоторые организмы способны использовать амилоидное состояние для получения уникальных структур, выполняющих различные полезные функции [172].

Однако, структурная конверсия белков, приводящая к появлению бетаскладок, и, связанное с ней формирование амилоидных фибрилл у человека, приводят к развитию нейродегенеративных заболеваний, которые на настоящий момент не имеют эффективных способов лечения. К их числу

[15] и [16], относят болезни Альцгеймера Паркинсона прионовые [17]. заболевания также называемые трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями и некоторые другие [13]. В общем случае, такие заболевания обусловлены потерей биологической активности белка в результате его разворачивания, после чего такой белок становится токсичным и агрегирует с формированием амилоидных фибрилл [13, 173].

Причины, приводящие к разворачиванию белковой молекулы и потере нативной конформации, до конца не установлены. Известно, что на процесс влияют аминокислотная последовательность, определенные мутации, а также различные факторы окружающей среды, такие как высокое или низкое значение pH, пост-трансляционная модификация, повышенная температура, гликирование и окислительный стресс.

Формирование амилоидных фибрилл представляет собой последовательный процесс, описываемый во времени сигмоидальной кривой (Рисунок 11). Он включает в себя разворачивание нативной структуры белка, формирование небольших белковых олигомеров, состоящих из 10-40 молекул мономерных белков, формирование зародышей фибрилл из олигомеров и, на заключительном этапе, - зрелых амилоидных фибрилл, бета-складчатой [173-175]. насыщенных структурой При ЭТОМ амилоидогенные белки (альфа-синуклеин, бета-амилоидный пептид, прион и др.) могут быть структурно и функционально не родственны, однако все они формируют фибриллы со схожей структурой.



Рисунок 11 – Схематическое изображение процесса формирования амилоидных фибрилл и кинетическая кривая процесса

Процесс характеризуется изменением вторичной структуры белка. Если в нативной конформации белка преобладают альфа-структура, либо структура статистического клубка, то уже олигомеры демонстрируют высокое содержание бета-складок, которое увеличивается с переходом в амилоидные фибриллы [175-177].

Амилоидные фибриллы, в свою очередь, представляют собой длинные неразветвленные структуры с диаметром 6 – 12 нм. Для различных семейств амилоидных белков было показано, что амилоидные фибриллы, скорее всего, представлены несколькими непрерывными параллельными бета-листами [178, 179]. Было установлено так же, что в таких структурах бета-тяжи ориентированы в плоскости перпендикулярной оси фибриллы и стабилизированы водородными связями параллельно оси фибриллы [180].

Однако, в последнее время накапливается все больше доказательств того, что именно метастабильные олигомеры и протофибриллы, а не зрелые амилоидные фибриллы, оказывают наиболее токсическое действие [181-183]. Строение таких олигомерных соединений различных белков была подтверждена в целом ряде случаев методами малоуглового рентгеновского

рассеяния (МУРР), динамического лазерного светорассеяния (ДЛС), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) [184-186].

1.6.2 Прионный белок

Среди различных амилоидогенных белков прионы занимают особое место, благодаря уникальному механизму передачи и распространения заболевания, в котором единственной инфекционной частицей является белок – прион. В настоящей работе проведено изучение комплексообразования дендримеров с полноцепочечным овечьим прионным белком, поэтому в следующей части обзора строение и функции данного белка будут рассмотрены более подробно.

1.6.2.1 Структура приона, прионовых олигомеров и фибрилл

Прионный белок – небольшой мембранный гликопротеин, состоящий из 254 аминокислотных остатков. Его экспрессия начинается еще во время эмбриогенеза, у взрослых особей прионный белок локализован в нейронах головного и спинного мозга.

Как и другие амилоидогенные белки, прионный белок может существовать в двух формах: нормальной клеточной форме (PrP^C) и форме, выделяемой из нервной ткани больных особей (PrP^{Sc}). На настоящий момент пространственная структура неинфекционной формы прионного белка (PrP^C) подробно изучена (Рисунок 12). В молекуле приона можно выделить два принципиально различающихся структурных домена: N-концевой – неструктурированный (остатки 23 - 128), и C-концевой, обладающим стабильной вторичной и третичной структурами (остатки 134 - 231) [187, 188]. В состав N-концевого фрагмента входят гидрофобный кластер, а также

участок октапептидных повторов, который может связываться с ионами меди, образуя хелатные комплексы, а также, возможно, вовлечен в процесс амилоидной трансформации белка. С-концевой домен представлен тремя альфа-спиралями (H1, H2 и H3, рисунок 12), две из которых соединены дисульфидным мостиком, и небольшим антипараллельным бета-листом. В состав С-концевого домена входит петлевой участок, соединяющий альфаспираль H2 и бета-тяж S2, обладающий большой тепловой подвижностью. В ряде исследований показано, что этот участок играет большую роль при трансформации нормальной клеточной прионного формы белка В неправильно свернутую [189, 190].



Рисунок 12 – Структура прионного белка PrP^C овец. А. Детальное строение структурированного домена PrP^C овец по данным рентген-структурного анализа. Отмечены α-спирали H1, H2 и H3, бета-тяжи S1 и S2..

Б. Схематичное изображение первичной структуры PrP сирийского хомячка. На схеме обозначены положения основных характерных консервативных сайтов.

В связи с нерастворимостью и невозможностью получения кристаллов амилоидных фибрилл прионного белка, точные данные об их строении отсутствуют. Из ранних работ [191, 192] известно, что при переходе в амилоидное состояние белок утрачивает первую альфа-спираль H1, которая полностью переходит в бета-структуру. Дальнейшие исследования с твердотельной спектроскопии использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и методов молекулярной динамики позволили установить углеродные атомы, являющиеся соседними в параллельных бета-тяжах [193]. Основываясь на этих данных, было выдвинуто несколько теорий о строении амилоидных фибрилл приона [180, 194]. Все они предполагают, что представляет собой сложное образование, фибрилла состоящее ИЗ нескольких бета-спиралей. Согласно одной из моделей, мономеры PrP^{Sc} могут тримеризоваться, контактируя боковыми сторонами бета-спиральных доменов. В свою очередь, тримеры, соединяются в фибриллу, подобно монетам в стопке. Бета-спиральные домены образующих её тримеров сливаются в три непрерывные бета-спирали, представляющие собой её структурную основу (Рисунок 12). Стоит также отметить, что фибриллы прионного белка являются протеазоустойчивыми, в отличие от клеточной формы.



Рисунок 12-Предполагаемая модель строения амилоидной фибриллы PrP [194]. А. Предполагаемая пространственная структура инфекционного мономера PrP^{Sc}. Б. Предполагаемая структура тримера PrP^{Sc} 27-30. В. Предполагаемая структура амилоидной фибриллы PrP^{Sc} 27-30

Комбинация методов МУРР, ДЛС и ПЭМ позволила охарактеризовать олигомеры прионного белка. Так, для рекомбинантного человеческого прионного белка PrP (90 - 231) было обнаружено существование двух различных структур с увеличенным содержанием бета-складок [185]. Одна соответствует 25-меру с гидродинамическим радиусом $r_{\rm H} = 13,1\pm0,4$ нм, другая - 100-меру с гидродинамическим радиусом $r_{\rm H} = 38,7\pm9,3$ нм. Обе структуры были получены при инкубации прионного пептида PrP (90 - 231) с гидродинамическим радиусом $r_{\rm H} = 2,2$ нм при повышенной температуре в присутствии ионов меди. Другой подход, основанный на термической агрегации полноцепочечного овечьего прионного белка, выявил наличие двух типов олигомеров с молекулярной массой 275 и 730 кДа, что

соответствует 12- и 32-меру. Оба типа олигомеров также характеризовались увеличенным вкладом бета-складчатой структуры [184].

1.6.2.2 Инфекционность приона, прионные заболевания и клеточные функции

К числу прионных заболеваний относятся такие болезни, как почесуха овец (скрепи), губчатая энцефалопатия коров, а также синдром Крейцфельда-Якоба, куру, синдром Герстманна-Штройслера-Шейнкера и хроническая семейная бессонница у человека. Все они являются неизлечимыми и, в конце концов, неминуемо ведут к смерти больного.

Природа инфекционного агента долгое время оставалась невыясненной. Лишь в конце прошлого века в лаборатории S. Prusiner было установлено, что инфекционный агент. вызывающий ЭТИ нейродегенеративные болезни, имеет исключительно белковую природу [195]. Настоящее открытие коренным образом изменило представления о механизмах передачи и распространения инфекционных заболеваний, ведь, являясь инфекционной частицей, прион не несет молекулы нуклеиновой кислоты в своем составе.

Молекулярные основы инфекционности приона лежат в способности его неправильно свернутой формы вызывать аналогичные изменения у клеточной формы белка [13, 196, 197]. Таким образом, процесс является автокаталитическим. При этом до конца не установлено, какая именно структурная форма приона является инфекционной. Согласно различным предположениям, связываться нормальной формой С могут как инфекционный неправильно свернутый мономер, так и олигомерные соединения, либо протофибриллы [197, 198]. Процесс ведет К трансформированных распространению И передаче патологически

конформаций между белками, клетками и организмами, вызывая прогрессирование и передачу заболевания.

Клеточные функции приона в нервной системе до конца не установлены. Предполагается, что он участвует в процессах долговременной потенциации – молекулярный механизм, ответственный за возникновение памяти. В работах Stys P.K. показано, что прион оказывает непосредственное влияние на NMDA рецепторы к глутамату, ингибируя их активность [199, 200]. Таким образом, прион может выполнять функции нейропротектора, предотвращая перевозбуждение нервной ткани при различного рода стрессовых ситуациях, блокируя долговременную потенциацию и не позволяя клеткам запоминать неадекватные сигналы, возникающие вследствие развивающегося патологического процесса.

Однако, многочисленные работы последних лет указывают на роль приона не только в развитии различного рода прионных заболеваний, довольно редко встречающихся у человека, но и в широко распространенной болезни Альцгеймера. Так, показано, что олигомеры пептида бета-амилоида селективно связываются с прионом [201-204]. Предполагается, что именно взаимодействие ЭТО ответственно за потерю памяти при болезни Альцгеймера. С одной стороны, это взаимодействие может быть своего рода защитной реакцией организма от перевозбуждения нервной ткани в условиях развивающегося патологического процесса. С другой стороны, процесс может носить патологический характер, приводя к нарушению регуляции NMDA рецепторов.

1.5.3 Способы воздействия на процесс амилоидной агрегации белков

Как это отмечалось ранее, формирование амилоидных агрегатов протекает ступенчато, поэтому существует несколько способов воздействия

на этот процесс (Рисунок 13) [205]. Одна из стратегий заключается в связывании исходного мономерного белка с лигандом, что приводит к стабилизации нативного состояния белка. Лиганд может также связываться с белком в состоянии олигомера, либо блокировать растущие концы фибрилл, предотвращая процесс фибриллизации. Другой подход – разрушение уже сформировавшихся агрегатов [205]. Однако, учитывая, что наибольшей токсичностью обладают именно олигомерные формы, соединения, способствующие разрушению амилоидных фибрилл, не должны вызывать их образования, что возможно при прочной ассоциации олигомеров или мономеров амилоидогенных белков с этими соединениями. Тем не менее, не следует преуменьшать роль амилоидных фибрилл в патологии нервных тканей. Известно, что шапероны-могут разрушать амилоидные фибриллы до агрегатов небольшого размера [206]. Кроме того, различные биологические макромолекулы могут разрушать фибриллы, переводя их в олигомеры. Таким образом, постоянным источником токсичных олигомеров амилоидогенных белков могут являться амилоидные фибриллы, уменьшение содержания которых должно оказывать профилактическое и лечебное действие при нейродегенеративных заболеваниях.



Рисунок 13 - Схематическое изображение возможных стратегий ингибирования процесса формирования амилоидных фибрилл. (а-б) –

Стабилизация нативной/развернутой структуры белка, (в-г) – стабилизация и предотвращение дальнейшей агрегации олигомерных форм белка, (д) – разрушение сформировавшихся амилоидных фибрилл.

1.5.4 Анти-амилоидные свойства дендримеров

В настоящее время не существует эффективных методов борьбы с прионными нейродегенеративными заболеваниями, а также с болезнью Альцгеймера. Некоторые успехи достигнуты с использованием небольших соединений [18], например, D-пептидов [207], полифенолов [19-22], флаваноидов [208], производных коричной кислоты [23]. Однако, использование мономерных соединений недостаточно эффективно, ввиду непрочного связывания с молекулой белка и, как следствие, недостаточной его стабилизации. Это обуславливает необходимость использования высоких концентраций указанных соединений, что наносит ущерб организму в целом.

Перспективным может быть использование полимерных соединений. Так, было показано, что некоторые полисульфоанионы могут подавлять агрегацию белков, а также разрушать существующие амилоидные агрегаты [24, 25]. Однако, использование полиэлектролитов затруднено их высокой полидисперсностью, причем «короткие» и «длинные» полиэлектролиты оказывают на белки и их агрегаты разное, иногда противоположное действие. Присутствие в используемой фракции полиэлектролитов компонентов разного размера не всегда позволяет добиться нужного эффекта и осложняет интерпретацию результатов.

В связи с этим перспективными соединениями, воздействующими на амилоидную агрегацию белков, представляются дендримеры. Они сочетают в себе преимущества полимерной высокоразветвленной структуры с большим количеством терминальных групп, с одной стороны, с монодисперсностью и

прекрасной характеризацией индивидуальных молекул, с другой. Так, дендритная форма молекулы обуславливает не только большое количество заряженных групп, но и их высокую плотность, что приводит к формированию прочных комплексов с белком. При этом используются невысокие концентрации дендримеров по сравнению с соединениями низкой молекулярной массы.

Дендримеры – первые соединения, способные разрушать сформировавшиеся амилоидные агрегаты и предотвращать фибрилизацию белков как *in vitro*, так и *in vivo*. Анти-амилоидные свойства проявляли ПАМАМ [209, 210], ППИ [211, 212], поли(этилен иминовые) (ПЭИ) [211, 213], фосфорные [214, 215], полилизиновые [216, 217], а также модифицированные мальтозными группами ППИ дендримеры [218, 219].

Дендримеры проявляли анти-амилоидные свойства против ряда амилоидогенных белков и пептидов: бета-амилоидного пептида [220-222], вовлеченного в развитие болезни Альцгеймера, альфа-синуклеина [223-226], принимающего участие в болезни Паркинсона, тау белка [227], вовлеченного болезни Альцгеймера и Паркинсона, и прионов [210-212, 228], В развитие губчатых энцефалопатий. Точный вызывающих механизм воздействия дендримеров до конца не установлен. Он включает в себя связывание с молекулой белка, либо белковыми агрегатами посредством электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей. Кроме того, ряд исследований говорит о том, что дендримеры более эффективно и с некоторой долей селективности связываются именно с развернутыми белками, либо белковыми агрегатами. Например, катионные дендримеры селективно связывались с агрегатами тау белка [227].

Имеющиеся на сегодняшний день исследования рассматривают как способность дендримеров ингибировать процесс амилоидной агрегации различных белков, так и разрушать существующие белковые агрегаты в пробирке, на клеточных линиях, а также *in vivo*.

Первые исследования анти-амилоидной активности дендримеров были проведены с использованием четырех генераций ПАМАМ дендримеров и ППИ дендримеров второй и четвертой генераций [211, 213, 228]. Исследования были проведены на клеточных линиях нейробластомы, зараженной скрэпи. Скрэпи – болезнь овец, вызываемая нарушением вторичной структуры прионного белка, который из нормальной формы (PrP^C) переходит в инфекционную (PrP^{Sc}), насыщенную бета-складками. Оказалось, что дендримеры способны удалять PrP^{Sc} из клеток нейробластомы, при этом с номером эффективность возрастала генерации. T.e., очевидно. антиамилоидная активность дендримеров связана с большим количеством заряда и его высокой плотностью. Это подтверждалось отсутствием эффекта при использовании нейтральных ПАМА-ОН дендримеров, а также линейных полимерных аналогов. Результат зависел также от концентрации дендримера и длительности эксперимента. Стоит отметить, что возникновение PrP^{Sc} не детектировалось в течение следующих трех недель после удаления дендримера из среды. Авторами было обнаружено, что после обработки дендримерами, PrP^{Sc} становится чувствителен к протеолизу (что характерно для нормальной клеточной формы приона), в то время как инфекционная форма характеризуется устойчивостью к действию протеазы К.

Перспективными анти-амилоидными агентами оказались также фосфорсодержащие дендримеры [214, 215, 229]. Они ингибировали формирование PrP^{Sc} в клетках нейробластомы [214]. Однако, авторами было обнаружено, что не всегда больший заряд дендримера ведет к увеличению его эффективности. Так, четвертая генерация оказалась более эффективна, чем третья, однако пятая оказывала меньший эффект по сравнению с четвертой. Это говорит о том, что для проявления наивысшей активности дендримера, необходим оптимальный баланс между его размером и количеством поверхностных функциональных групп.

Поскольку проведение *in vivo* испытаний связано с большими трудностями, a также сложностью интерпретации результатов, при скрининге анти-амилоидных агентов, как правило, проводят in vitro Они испытания. позволяют установить основные закономерности взаимодействия компонентов, грамотно и аккуратно охарактеризовать полученный результат, подобрать оптимальные условия, выявить природу взаимодействий.

Проведение экспериментов in vitro подтвердило способность дендримеров влиять на процесс амилоидной агрегации белков. При этом *in* vitro испытания позволили не только изучить влияние дендримеров на сформировавшиеся агрегаты, как это было проведено на линиях клеток, но и оценить способность дендримеров препятствовать процессу амилоидной агрегации белков. Оказалось, что решающую роль в проявлении антиамилоидной активности играла структура дендримера, а именно большой заряд и его высокая плотность. Дендримеры проявляли анти-амилоидные свойства в отличие от линейных аналогов одинакового молекулярного веса и заряда [213]. Так, модифицированные гуанидиновыми группами ППИ дендримеры значительно эффективнее подавляли фибрилизацию прионного пептида 106-126 по сравнению с немодифицированными [154]. При этом дендримеры с гуанидиновыми группами были полностью заряжены, в то время как немодифицированные несли меньший заряд. Сравнение катионных ПАМАМ дендримеров с нейтральными ПАМАМ-ОН дендримерами выявило аналогичную закономерность: катионные дендримеры были активнее гидроксильных аналогов [230].

Способность разрушать амилоидные агрегаты проявляли не только катионные дендримеры, но и нейтральные модифицированные мальтозными группами ППИ дендримеры [218, 219]. При этом аналогичный дендример, в котором часть поверхностных мальтозных групп была заменена на ПЭГ с концевыми аминогруппами, не оказывал никакого влияния на белковые

агрегаты [37]. В данном случае ПЭГ выступал в качестве гибкого спейсера, уменьшая плотность поверхностных функциональных групп.

Однако, стоит отметить, что способность наиболее часто используемых аминосодержащих дендримеров подавлять агрегацию белков сильно зависит от pH. Подробно данная зависимость исследована в работе [231]. Эффект обусловлен степенью протонирования как дендримера, так и белка. Стоит отметить, что наиболее выгодные условия для формирования комплексов между дендримером и белком находятся в кислых значениях среды [37, 211, 213, 231], при которых достигается высокая степени ионизации как аминогрупп дендримера, так и гистидиновых остатков белка. Так, ПЭИ и ППИ дендримеры, эффективно удалявшие PrP^{Sc} из клеток нейробластомы при кислом значении среды (pH = 4,0), не оказывали воздействия в нейтральных условиях [211, 213]. Таким образом, применимость таких pH-зависимых дендримеров в *in vivo* условиях, где физиологический уровень pH лежит в нейтральных значениях (7,4) имеет значительные ограничения.

необходимо Другой важный аспект, который учитывать при ΠAMAM, ППИ, использовании гибких дендримеров, таких как полилизиновые, карбосилановые, - это способность цепей этих дендримеров сворачиваться, что приводит к изменению количества поверхностных функциональных групп, и, как следствие, изменяет взаимодействие с белком [37, 40, 41, 232].

Стоит также отметить, что использование катионных дендримеров является предпочтительным. Анионные ППИ дендримеры пятой генерации, модифицированные сульфогруппами, приводили к уменьшению PrP^{Sc} *in vitro*, однако, оказались не эффективны при исследовании на линиях клеток [37]. Разница, по всей видимости, может быть объяснена низкой проницаемостью отрицательно заряженных клеточных мембран для анионных дендримеров.

Обзор и анализ публикаций показывают, что, благодаря своим характеристикам, дендримеры являются перспективными уникальным соединениями для применения в биологических целях. Кроме того, комплексообразование с белками лежит в основе некоторых видов биологической активности дендримеров, в том числе анти-амилоидной. Вместе с тем, имеющиеся к настоящему моменту исследования не охватывают весь спектр процессов взаимодействия дендримеров С амилоидогенными белками, не вносят ясности в механизм их взаимодействия и активности, а также проведены с использованием гибких, как правило, аминосодержащих дендримеров, чувствительных к изменению рН среды, и укороченных пептидов. Поэтому представлялось целесообразным поэтапно изучить взаимодействие катионных пиридилфениленовых дендримеров с полноцепочечным амилоидогенным белком. Для данного типа дендримеров характерны жесткость, постоянство отсутствие заряда, зависимости поведения в растворе от свойств растворителя, температуры и рН.

2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Получение катионных пиридилфениленовых дендримеров состоит из двух этапов:

- синтез исходных гидрофобных пиридилфениленовых дендримеров,

- перевод гидрофобных дендримеров в водорастворимое состояние путем алкилирования их пиридильных фрагментов.

Синтез исходных дендримеров проводился по методике, разработанной в нашей лаборатории ранее [233], и заключался в повторяющейся последовательности двух реакций, одна из которых – реакция роста – вела к увеличению генерации дендримера за счет присоединения «строительных блоков», другая – стадия активации – к появлению активных групп на периферии молекулы, способных к дальнейшему росту цепи (Рисунок 14) [234].



Рисунок 14 - Общая схема синтеза пиридилфениленовых дендримеров по реакции Дильса-Альдера

В [4+2]качестве роста использовали реакцию реакции циклоприсоединения ПО Дильсу-Альдеру тетраарилзамещенных циклопентадиенонов К этинил-содержащим соединениям. Циклопентадиеноны были получены Кновенагеля по реакции взаимодействием соответствующих арилзамещенных 1,2-этандионов и бис(αдикетонов) известной методике, разработанной ранее [233]. по Циклопентадиеноны, используемые в качестве разветвляющих фрагментов, представляют собой AB_2 мономеры, в которых одна функциональность («А») активна в реакции Дильса-Альдера, а две другие («В») остаются инертны (Рисунок 15, 1). Так, в реакцию с этинил-содержащими соединениями (центральный фрагмент, либо дендримеры более низких генераций) вступает диеновая составляющая, в то время как этинильные группы (диенофильные группы циклопентадиенонане не участвуют в реакции за счет замещения объемными триизопропилсилильными заместителями. В случае, если дальнейших рост дендримера не предусмотрен задачами исследования в участвуют реакции Дильса-Альдера тетраарилзамещенные циклопентадиеноны не несущие диенофильные группы (Рисунок 15, 2,3)



Рисунок 15 – Использованные в работе тетраарилзамещенные циклопентадиеноны

Стадия активации – реакция десилилирования, приводящая к появлению концевых этинильных групп, которые вступают в реакцию циклоприсоединения со следующей порцией AB₂ мономера (Рисунок 14).

Таким образом, дивергентным был получен методом ряд пиридилфениленовых дендримеров трех генераций, используемых в качестве гидрофобных предшественников водорастворимых дендримеров, используемых в настоящем диссертационном исследовании (рисунок 16). В качестве центрального фрагмента использовали 1,3,5-триэтинилбензол, являющийся коммерчески доступным продуктом. Путем варьирования строительных блоков возможно получение дендримеров с различным соотношением пиридильных И фенильных фрагментов, однако, для получения гидрофильных аналогов важно использовать преимущественно циклопентадиеноны с максимально возможным числом пиридильных групп в структуре, так как с увеличением числа пиридильных фрагментов в дендримерах увеличивается сродство их макромолекул к полярным растворителям. Для получения бездефектных молекул синтез дендримеров проводили согласно условиям (время и температура реакции, соотношение реагентов, выделение и очистка), разработанным ранее [233, 234]. Все дендримеры были получены с выходами 65-90 %.

Далее по тексту будет использована следующая аббревиатура: Gn-ТиПСА/этин, где n – номер генерации, ТиПСА/этин – в случае наличия триизопропильных или этинильных заместителей концевых групп.



Рисунок 16 – Синтез пиридилфениленовых дендримеров



Рисунок 16 (Продолжение) - Синтез пиридилфениленовых дендримеров

Для подтверждения строения и чистоты дендримеров использовали методы ЯМР спектроскопии, MALDI ToF масс-спектрометрии и элементного анализа.

В качестве примера на рисунке 17 приведен ¹Н ЯМР спектр дендримера G₂. Во всех случаях в спектрах ЯМР ¹Н регистрируются сигналы протона, образующегося В результате реакции Дильса-Альдера пентафенилзамещенного бензольного звена, причем ИХ количество изменяется с ростом генераций. Так, в спектре дендримера второго области δ=7.67-7.53 М.Д. присутствуют поколения В два синглета, относящиеся к протонам пентазамещенных фенильных звеньев первого и второго слоев дендримера (1, 1'). Кроме того, определены сигналы αпротонов неэквивалентных пиридиновых фрагментов (d=8.6-8.15 м.д.), смещенные в область слабого поля. При исследовании дендритных молекул, содержащих этинильные или ТиПС группы, в качестве косвенного подтверждения их строения было использовано интегральное соотношение сигналов протонов в алифатической и ароматической областях. Получить более детальную информацию о строении дендримеров из спектров ЯМР невозможно ввиду перекрывания сигналов в ароматической области.



Рисунок 17 -¹Н ЯМР спектр пиридилфениленового дендримера второй

генерации

Отсутствие продуктов недозамещения достоверно фиксировали с время-пролетной лазерной десорбционноиспользованием метода ионизационной масс-спектрометрии с участием матрицы (MALDI ToF matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). Kak видно из приведенных масс-спектров (Рисунок 18), для всех дендримеров регистрируются интенсивные сигналы, которые полностью соответствуют рассчитанной молекулярной массе. Отсутствие в спектрах каких-либо дополнительных сигналов, которые могли бы принадлежать продуктам неполного циклоприсоединения циклопентадиенонов к этинильным группам Дильса-Альдера, реакции чистоту дендримера ПО подтверждало синтезированных макромолекул и их монодисперсность.





Рисунок 18 - Масс - спектры MALDIToF пиридилфениленовых дендримеров $G_2(a), G_3(b)$ и $G_4(b)$

Элементный анализ синтезированных молекул во всех случаях соответствовал рассчитанному, либо находился в пределах ошибки метода (0,5 %) (Таблица 3).

Таблица	3	-	Рассчитанный	И	найденный	элементный	состав
пиридилф	енил	ено	вых дендримеров				

	Молекулярная формула	Элементный состав, (%)			
Дендример		рассчит./ найдено			
		С	Н	N	
G ₁ -ТиПСА	$C_{156}H_{180}N_6Si_6$	81,19/79,73	7,86/7,69	3,64/3,47	
G1-этин	$C_{102}H_{60}N_6$	89,45/87,95	4,42/4,35	6,14/6,05	
G ₂	$C_{258}H_{168}N_{18}$	88,03/87,16	4,81/4,73	7,16/6,97	
G ₂ -ТиПСА	$C_{390}H_{408}N_{18}Si_{12}$	82,40/81,76	7,23/7,11	4,44/4,27	
G ₂ -этин	$C_{282}H_{168}N_{18}$	88,93/87,06	4,45/4,26	6,62/6,43	
G ₃	$C_{570}H_{360}N_{66}$	84,17/82,93	4,46/4,24	11,37/11,16	
G ₃ -ТиПСА	$C_{858}H_{864}N_{42}Si_{24}$	82,85/81,13	7,01/6,83	4,72/4,59	
G3-этин	$C_{642}H_{384}N_{42}$	88,77/86,54	4,47/3,99	6,76/6,21	
G_4	C ₁₂₁₈ H ₇₆₈ N ₁₃₈	84,39/83,02	4,47/3,96	11,15/10,85	

были алкилированием Водорастворимые дендримеры получены гидрофобных дендримеров Меншуткина исходных ПО реакции С использованием диметилсульфата в качестве алкилируещего агента. В качестве примера на рисунке 19 приведена реакция алкилирования второй генерации дендримера. Реакция протекает с образованием пиридиниевого катиона.



Рисунок 19 - Синтез алкилированного дендримера второй генерации

Стоит отметить, что алкилирование пиридилфениленовых дендримеров такими агентами, как метил иодид или бромэтанол, не привело к получению растворимых в воде дендримеров, так как достигаемая при этом степень алкилирования была невелика. Однако, использование диметилсульфата, являющегося небольшим и активным алкилирующим агентом, позволило получить водорастворимые молекулы со степенью алкилирования 75-85 %.

Для дальнейшего исследования комплексообразования с белком были выбраны дендримеры второй (G2), третьей (G3) и четвертой (G4) генераций, изображенные на рисунке 20.



Рисунок 20 – Катионные пиридилфениленовые дендримеры второй (G2), третьей (G3) и четвертой (G4) генераций

Степень алкилирования определяли на основании данных элементного анализа на серу, содержащуюся в противоионе, а также из данных ¹Н ЯМР спектров по соотношению интегралов сигналов протонов метильных групп и сигналов протонов ароматических фрагментов. Полученные таким образом значения степени алкилирования (β) находились в хорошей корреляции друг с другом (Таблица 4). Характеристика катионных пиридилфениленовых дендримеров приведена в таблице 4.

Дендример	Описание	Степень алкилирования		Заряд*	Молекулярная масса
		Эл.анализ	¹ H ЯМР		
G2	Дендример второй генерации, 18 пиридильных групп	85 %	82 %	15 «+»	5142.29
G3	Дендример третьей генерации, 66пиридильных групп	75 %	73 %	50 «+»	14440.17
G4	Дендример четвертой генерации, 138 пиридильных групп	83 %	82%	115 «+»	31841.58

Таблица 4 – Характеристика катионных пиридилфениленовых дендримеров

* рассчитанный на основании найденной степени алкилирования

2.2 ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ КАТИОННЫХ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Синтезированные образцы катионных пиридилфениленовых дендримеров представляют собой порошки темно-коричневого цвета, хорошо растворимые в водных и водно-солевых растворах, таких как калийфосфатный буфер, буферы MOPS, Tris, PBS.

Стоит отметить, что, в отличие от наиболее часто используемых полиаминных дендримеров, катионные пиридилфениленовые дендримеры характеризуются постоянством заряда и его независимостью от pH, так как положительный заряд в данном случае обеспечивается наличием четвертичного азота в структуре дендримера. Ограниченное вращение вокруг одинарных С-С связей, соединяющих ароматические кольца, обуславливает жесткость структуры в целом. За счет этого, ветви данных дендримеров не претерпевают так называемый "backfolding", т.е. не заворачиваются внутрь и количество терминальных групп, экспонированных в растворитель, всегда остается неизменным. В конечном итоге эти свойства ведут к неизменности взаимодействия дендримеров с биологическими объектами, в том числе белками, при любых условиях среды.

2.2.1 Динамическое лазерное светорассеяние

Методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) были определены размеры синтезированных катионных дендримеров. Как видно из рисунка 21, гидродинамический диаметр дендримеров составил 5, 5 и 32 нм для дендримеров второй, третьей и четвертой генераций, соответственно. Следует отметить, что метод ДЛС позволяет обнаружить очень малое количество частиц, особенно в тех случаях, когда их размеры составляют сотни нанометров. Важно также, что метод не позволяет количественно сравнить содержание частиц в различных препаратах, а лишь лает возможность оценить соотношение частиц разного размера в одной пробе. Использованное объемное распределение по размерам позволяет эффективно детектировать присутствие как небольших частиц с гидродинамическим диаметром, составляющим несколько нанометров, так и более крупных с размерами несколько десятков нанометров [235]. Таким образом, согласно результатам ДЛС (рисунок 21), образцы синтезированных дендримеров представляют собой однородные молекулы с узким распределением по размерам.

Исключение составил дендример четвертой генерации, чей найденный гидродинамический диаметр (32 нм) превышает расчетный (7 нм) (в программе Chem3D Pro). Это может быть объяснено склонностью данного дендримера к формированию агрегатов в растворе ввиду возросшей степени гидрофобности. Так, катионный пиридилфениленовый дендример может рассматриваться как амфифильная молекула с гидрофильной поверхностью и

гидрофобной внутренней частью. При этом при переходе к большему поколению возрастает число фениленовых групп, что ведет к росту гидрофобности. Подобное поведение было также обнаружено для исходных органорастворимых дендримеров [236]. Методом МУРР было обнаружено существование дендримерных ассоциатов, состоящих из 10 молекул. Однако, их содержание в образце не превышало нескольких процентов [235].



Рисунок 21– Объемное распределение гидродинамических диаметров дендримеров второй (квадрат), третьей (круг) и четвертой (треугольник) генераций

2.2.2 Спектры поглощения

Были исследованы спектральные характеристики дендримеров в диапазоне длин волн 200 – 600 нм. Спектр дендримера (Рисунок 22) характеризуется наличием максимума при 280 нм, соответствующего ароматической структуре, а также входящим в состав гетероатомам (N). Дендримеры разных генераций демонстрировали одинаковый характер полос поглощения, в качестве примера на рисунке 22 приведен спектр дендримера третьей генерации, записанный при разных концентрациях раствора.



Рисунок 22 – Спектр поглощения катионного пиридилфениленового дендримера третьей генерации

Построение зависимости оптической плотности при 280 нм от концентрации (Рисунок 23) позволило определить коэффициент экстинкции для всех трех генераций дендримера, согласно закону Бугера-Ламберта-Беера. Дендримеры демонстрировали приблизительно одинаковые значения є~16. Аналогичным образом были получены коэффициенты экстинкции при других значениях длин волн (Таблица 5).


Рисунок 23 – Зависимость оптической плотности от длины волны и расчет коэффициентов экстинкции при длине волны 280 нм для G2, G3 иG4 в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH = 7.5

Таблица 5.- Значения коэффициентов экстинкции для дендримеров второй, третьей и четвертой генераций, рассчитанные в мл/(мгсм) (А), а также в л/моль см (Б)

A	Дендример	280 нм	310 нм	330 нм	350 нм
	G2	15.1	6.34	3.32	1.64
	G3	16.5	7.61	4.26	2.91
	G4	15.7	8.17	4.63	3.68

Б

Дендример	280 нм	310 нм	330 нм	350 нм
G2	$0.78 * 10^5$	$0.33 * 10^5$	$0.17 * 10^5$	$0.84 * 10^4$
G3	$2.40 * 10^5$	$1.11 * 10^5$	$0.62 * 10^5$	$4.20 * 10^4$
G4	$4.98 * 10^5$	$2.59 * 10^5$	$1.47 * 10^5$	$11.7 * 10^4$

2.2.3 Разделение дендримеров методом фракционирования в ассиметричном потоке поля

При фракционировании в ассиметричном потоке поля, дендримеры показали различное время удерживания: 13, 14 и 15 мин для G2, G3 и G4, соответственно. Согласно данным фрактограммы (Рисунок 24), дендримеры были получены с 98 % чистотой.



Рисунок 24 – Фрактограммы дендримеров второй (а), третьей (б) и четвертой (в) генераций, полученные разделением в ассиметричном потоке поля.

2.2.4 Моделирование методом молекулярной динамики

Поскольку для пиридилфениленовых дендримеров не доступна экспериментально разрешенная трехмерная структура, представлялось интересным определить топологию молекул. Расчеты были проведены для

G4, так как он обладает наиболее выраженной трехмерной структурой. Для этого химическая структура дендримера G4 в полностью заряженном состоянии была нарисована в программном пакете ChemBioDraw. Из полученной двумерной структуры с помощью программы ChemBio3D была трехмерной которая была сгенерирована модель структуры, затем подвергнута минимизации энергии в вакууме в силовом поле MM2. После тщательного рассмотрения в модели были выявлены искаженные валентные углы и длины связей, свидетельствующие о необходимости более полной и точной процедуры минимизации энергии. Наиболее приемлемым средством решения данной задачи оказался молекулярно-динамический пакет Desmond (D.E. ShawResearch), с помощью которого удалось сгенерировать топологию дендримера G4 в полноатомном силовом поле OPLS 2005 и последовательно провести минимизацию энергии методом наискорейшего спуска сначала в вакууме, а затем и в водном растворе. Проведенная после этого симуляция длительностью 2 нс молекулярной динамики позволила установить равновесные координаты полученной модели (Рисунок 25). Как видно из рисунка, дендример представляет собой частицу радиусом 3,5 нм в форме несимметричного трехлопастного винта с 2 большими углами примерно по 125-130 градусов, и малым углом примерно 100-110 градусов.



Рисунок 25 – 3D модель дендримера четвертой генерации G4, полученная методом молекулярной динамики в полноатомном силовом поле OPLS_2005

2.3 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕНДРИМЕРОВ С НАТИВНЫМ ПРИОННЫМ БЕЛКОМ

Для понимания процессов, приводящих к желаемому терапевтическому эффекту, необходим детальный анализ свойств, состава, характеристик формируемых комплексов, а также фундаментальных закономерностей их образования. Такие знания позволят в дальнейшем заданным образом варьировать молекулярные характеристики макромолекулы и, как следствие, формируемых комплексов с целью достижения оптимального эффекта. Поэтому на первом этапе было проведено всестороннее изучение комплексообразования катионных пиридилфениленовых дендримеров с нативным прионным белком [237].

2.3.1 Изотермическая титрационная калориметрия

Для изучения взаимодействия между прионным белком И дендримерами был использован метод изотермической титрационной калориметрии (ИТК). Полученные изотермы связывания приведены на рисунке 26 А, Б. Из представленных кривых очевидно, что взаимодействие прионного белка с дендримерами 2 и 3 генераций значительно отличается. Так, если титрование прионного белка дендримером G2 сопровождалось выраженным выделением тепла, то тепловой процесс при связывании прионного белка и G3 выражен в значительно меньшей степени. Тем не менее, в обоих случаях процесс экзотермический. При этом константа ассоциации прионного белка с G3 оказалась на порядок выше, чем с дендримером 2 поколения. Исходя из приведенных на рисунке 26 значений термодинамических параметров связывания, заключить, можно что повышенная прочность связывания G3 с прионным белком обусловлена

энтропийным вкладом и, вероятно, связана с возникновением гидрофобных взаимодействий. Необходимо отметить, что титрование сопровождается достаточно большим фоновым теплопоглощением, которое может быть связано с диссоциацией надмолекулярных ассоциатов дендримера. Учитывая данный факт, а также возможные конформационные изменения в белке, происходящие под действием дендримеров, точное определение константы связывания требует применения сложной модели. Поэтому полученные значения константы связывания И стехиометрии являются ЛИШЬ приблизительной оценкой. По этой же причине получить результаты для G4, буфера контрольное титрование раствором так как дендримера сопровождается выделением тепла, соизмеримого с количеством тепла, выделямого при связывании белка с дендримером.



Рисунок 26 - Изотермы связывания, полученные при калориметрическом титровании прионного белка дендримерами G2 (A) иG3 (Б). Стехиометрия (N), константа ассоциации (K), энтальпия (Δ H) и энтропия (Δ S) связывания показаны на нижних панелях и определены с использованием модели "one site of sites"

2.3.2 Моделирование методом молекулярной динамики

Для того чтобы проанализировать механизм взаимодействия, а также определить сайты связывания дендримеров с белком, было проведено моделирование методом молекулярной динамики. Эксперименты были проведены для G2 и G3. G4 изучен не был, ввиду своего большого размера и, следствие, сложности оптимизации полноатомной как модели взаимодействия. Результаты моделирования позволили определить потенциальные сайты связывания, изображенные на рисунке 27. Молекула прионного белка имеет два сайта, доступных для связывания дендримера, в основной цепи, а также один сайт, расположенный в боковой цепи. При этом связывание G2 может происходить одновременно по всем указанным сайтам, в то время как связывание G3 с боковым сайтом блокирует взаимодействие с основными, и наоборот. Так, если две молекулы G3 связались с основными сайтами, связывания с боковым сайтом не происходило. Всего, согласно результатам моделирования, прионный белок способен одновременно связать 3 – 4 молекулы G2 и всего две молекулы G3. Сайты насыщены кислотными остатками и представляют собой отрицательно заряженные участки белка, включающие остатки Асп, Глу, а также С-концевой Тир. (Рисунок 27 Г).

Связывание сопровождалось формированием ионных пар (Рисунок 28 А). При этом не наблюдалось диссоциации комплекса и каждая молекула дендримера оставалась связанной вплоть до конца симуляций в течение 20 – 30 нс. С другой стороны, неполярные контакты были также вовлечены в связывание и число неполярных углеродных атомов в радиусе 0,35 нм незначительно возрастало после взаимодействия с дендримером (Рисунок 28 Б). Стоит также отметить, что общее число ионных пар, формируемых между белком и G3 равно или немного превышает число ионных пар, образующихся с G2 (Рисунок 28 А). Учитывая тот факт, что с белком

связывается меньшее количество молекул G3, очевидно каждая молекула G3 способна формировать большее количество ионных пар с белком.



Рисунок 27 - Результаты моделирования взаимодействия прионного белка с G2 (A) и G3 (Б) методом молекулярной динамики. Дендримеры показаны серым цветом с синими молекулами азота, белок окрашен согласно электростатическому потенциалу поверхности, при этом положительно заряженные области окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные – в красный. На рисунке В показано увеличенное изображение взаимодействия дендримеров с белком. Рисунок Г отображает аминокислотные остатки, участвующие в связывании дендримера. Структура прионного белка взята из базы данных PDB entry 1tqb.

Кроме того, были проанализированы изменения вторичной структуры белка при взаимодействии с дендримером. Согласно данным об изменении среднеквадратичных отклонений атомных позиций белка (RMSD) во времени, G3 оказывал бо́льшее влияние на структуру прионного белка, чем G2 (Рисунок 28, В). Тем не менее, в нескольких симуляциях с G2 значения RMSD также возрастали (две типичные кривые показаны на рисунке 28, В).

Согласно значениям RMSD на каждый аминокислотный остаток (Рисунок 29, А), основная часть структуры белка оставалась интактной в обоих случаях, однако один из основных связывающих сайтов (остатки 190 – 200, включая Глу199 и Асн200) может изменяться под действием G2. В случае G3 все симуляции можно разделить на две группы в зависимости от места связывания. Связывание G3 с боковой цепью белка не приводило к изменению его структуры, однако взаимодействие с основной цепью влияло на всю молекулу (Рисунок 29, А), и общее значение RMSD было выше в случае G3 по сравнению с G2.

Изменения, происходящие в структуре белка при взаимодействии с дендримерами, показаны на рисунке 29 Б,В. Связывание дендримеров с основной цепью вызывало перестройку N- и C-концевых фрагментов, а также участка, включающего аминокислотные остатки 190-200. Структурные

изменения повлекли за собой и изменения во вторичной структуре: частично пропал участок 175-160 альфа-спирали. Взаимодействие с G3 также приводило к изменениям участка 130-170.



Рисунок 28 – Типичные кривые зависимости числа ионных пар от времени (А) и неполярных контактов (Б), возникающих при взаимодействии пиридилфениленовых дендримеров с прионным белком. На рисунке В представлено среднеквадратичное отклонение атомных позиций (RMSD) белка. На рисунке А, Б в качестве примера приведены одна симуляция с G2 и две независимые симуляции с G3; на рисунке В – две кривые для G2 и одна для G3



Рисунок 29 - (А) Типичные кривые изменения значений RMSD на аминокислотный остаток, усредненные на основании последних 10 нс моделирования взаимодействия овечьего прионного белка с G2 (верхняя панель) и G3 (нижняя панель). Кривые 1 и 2 отображают связывание дендримеров с боковым и основным сайтами, соответственно. (Б) Изменения, происходящие во вторичной структуре приона при взаимодействии с G2 и G3. (В) Сравнение структуры прионного белка до (зеленый цвет) и после (оранжевый цвет) связывания с дендримерами.

2.3.3 Динамическое лазерное светорассеяние

Размеры формируемых комплексов между овечьим прионным белком и катионными пиридилфениленовыми дендримерами были оценены с помощью ДЛС. Анализ показал увеличение размера по сравнению с чистым прионным белком в случае всех трех использованных дендримеров (рисунок 30). В то время как размер прионного белка равен 4,0 нм, взаимодействие с дендримерами привело к формированию комплексов с размерами 7, 7,5 и 18 нм для дендримеров G2, G3 и G4, соответственно.



Рисунок 30 - Объемное распределение гидродинамических диаметров комплексов прионного белка с дендримерами второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций.

2.3.4 Спектроскопия кругового дихроизма

Метод КД широко используется для изучения структуры белков и ее изменения при действии различных факторов. Различные типы белковой укладки обладают характерными видами спектров КД в дальнем УФ, а об изменениях кривой позволяют изменения делать вывод В пространственной структуре белка. Например, исчезновение пика на спектре КД добавлении при денатурирующих агентов (мочевины или гуанидингидрохлорида) или при повышении температуры можно количественно использовать при изучении стабильности нативного белка.

Как видно из рисунка 31, положение минимума на КД спектре нативного прионного белка (красная линия) соответствует преобладанию альфа-структуры. Добавление дендримеров вплоть до 5-кратного молярного избытка не оказало существенного влияния на характер спектров. Таким образом, согласно результатам КД спектроскопии, взаимодействие дендримеров с прионным белком не оказывает значительного влияния на его вторичную структуру и не вызывает разворачивания, либо денатурации белка. В качестве примера на рисунке 31 приведены КД спектры прионного белка при добавлении G3. Для G2 и G4 были получены аналогичные результаты.



Рисунок 31 – Спектры КД прионного белка в присутствии катионного пиридилфениленового дендримера третьей генерации в разных молярных соотношениях.

2.3.5 Тушение собственной флуоресценции белка под действием дендримеров

Собственная флуоресценция белков широко используется при изучении их структуры, а также реакций ассоциации и денатурации. Она обусловлена присутствием в первую очередь триптофановых остатков, индольные кольца которых – уникально чувствительные флуорофоры. Кроме того, триптофан оказывается чрезвычайно чувствителен к тушению различными соединениями, В частности N-алкилпиридиниевыми И пиколиниевыми солями [238, 239].

Наличие в структуре прионного белка 7 триптофановых остатков позволило использовать метод тушения флуоресценции для изучения комплексообразования с дендримерами. Для исключения вклада в флуоресценцию тирозиновых остатков, возбуждение проводили при длине волны 295 нм, где поглощение тирозина минимально и наблюдается только

испускание триптофана. Эксперименты показали, все использованные дендримеры эффективно тушат флуоресценцию, по-видимому, за счет наличия в своей структуре пиридиниевых групп (Рисунок 32). Стоит отметить, что в использованных концентрациях поглощение дендримеров при длинах волн 350-600 нм отсутствует, либо принебрежимо мало (Рисунок 22), поэтому эффект тушения флуоресценции вызван истинным тушением за счет формирования комплекса, а не за счет кажущегося тушения вследствие оптических свойств образца, когда высокая оптическая плотность может приводить к уменьшению интенсивности флуоресценции.

Максимум флуоресценции прионного белка наблюдался при длине волны 352нм (Рисунок 32, черная линия). Однако при возбуждении при длине волны 295 нм дендримеры также демонстрировали флуоресценцию. Тем не менее, максимум флуоресценции дендримеров расположен в длинноволновой области и не затрудняет оценку изменений, происходящих в спектре эмиссии триптофана. Как это видно из спектров (рисунок 32), под воздействием дендримеров происходит закономерное уменьшение интенсивности флуоресценции триптофановых остатков. При этом эффект становится наиболее выраженным с увеличением концентрации дендримера. Рост концентрации дендримера приводит также к росту вклада в спектр флуоресценции дендримерной составляющей: если при добавлении 0,5 µМ G2 спектр эмиссии характеризуется незначительным падением интенсивности флуоресценции триптофановых остатков и появлением плеча при 465 нм (Рисунок 32, А), то при добавлении 2 µМ дендримера триптофана флуоресценция снижается гораздо сильнее, при ЭТОМ интенсивность флуоресценции дендримера становится соизмеримой с флуоресценцией белка.





Рисунок 32 - Кривые тушения собственной флуоресценции прионного белка дендримерами второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций

Как следует из рисунка 33, наиболее выраженные изменения в спектре флуоресценции прионного белка происходят под воздействием G4, тогда как наименьшее влияние оказывает G2. При возрастании генерации дендримера эффективность тушения последовательно нарастает и добавление уже первых порций дендримера четвертой генерации приводит к значительному снижению флуоресценции. Очевидно, что для тушения необходим контакт между молекулами флуорофора и тушителя. Поэтому изменения, происходящие в спектре эмиссии триптофана, говорят об эффективном



Рисунок 33 - Кривые тушения собственной флуоресценции прионного белка под действием 0,5 µМ катионных пиридилфениленовых дендримеров разных генераций

Тушение флуоресценции в белках описывается уравнением Штерна-Фольмера [32, 240]:

 $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad ,$

где K_{SV} – константа тушения, [Q] – концентрация тушителя, F_0 и F – интенсивности флуоресценции в отсутствие и присутствии тушителя, соответственно. Уравнение описывает динамическое тушение флуоресценции и предполагает линейную зависимость F_0/F от [Q]. Расчет K_{SV} позволяет количественно определить эффективность взаимодействия дендримеров с прионным белком.

Зависимости относительной интенсивности флуоресценции от концентрации дендримера представлены на рисунке 34, а рассчитанные константы Штерна-Фольмера для всех использованных дендримеров суммированы в таблице 6. Как это видно из рисунка 34, зависимость относительной интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя (дендримера) представляет собой прямую линию, угол наклона которой равен K_{SV}. В общем случае, наиболее чувствительная система характеризуется более крутым наклоном кривой и, следовательно, большей величиной K_{SV}.



Рисунок 34 - Кривые зависимости относительной интенсивности флуоресценции от концентрации дендримеров второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций

Таблица 6 - Рассчитанные константы Штерна-Фольмера

Дендример	$\mathbf{K}_{\mathbf{SV}}(\mathbf{M}^{-1})$
G2	1.5×10^{5}
G3	1.3×10^{6}
G 4	2.9×10^{6}

Как и следовало ожидать, взаимодействие прионного белка с G4 характеризуется наибольшим значением K_{SV}, что означает, что сила растет взаимодействия дендримеров с белком последовательно С увеличением генерации. Такое поведение отличается от поведения линейных систем, у которых снижение степени полимеризации тушителя приводит к эффективности тушения, особенно увеличению заметного В случае олигомерных тушителей. Очевидно, жесткость молекулы дендримера не позволяет ей проникнуть внутрь белковой глобулы, даже несмотря на гидрофобной составляющей стремление дендримера находиться В гидрофобном окружении белковой матрицы. Поэтому уменьшение размера дендримера с уменьшением его генерации не приводит к увеличению эффективности тушения.

Флуоресценция триптофановых остатков чрезвычайно чувствительна к изменениям микроокружения, что позволяет использовать этот метод для оценки конформационных изменений, происходящих в белке под действием лиганда. Известно, что присутствующие в молекуле белков триптофановые остатки разделяется на пять дискретных классов согласно положению максимума спектра эмиссии [241] в зависимости от их локализации (внутри белка либо на поверхности) и окружения. Таким образом, изменения, происходящие в структуре белка, отражаются в спектре его эмиссии. обусловлено Коротковолновое положение спектра гидрофобностью микроокружения, либо его жесткостью, в то время как длинноволновое говорит о полярности микроокружения ввиду доступности триптофанового остатка молекулам растворителя. Другими словами, сдвиг максимума флуоресценции триптофана в длинноволновую область при взаимодействии белка с лигандом свидетельствует о том, что триптофановые остатки экспонированы в раствор, в то время как коротковолновый сдвиг является результатом экранирования триптофана белковой матрицей [242]. При добавлении дендримеров спектр эмиссии триптофана характеризуется

уширением пика, однако положение максимума не меняется. Эффект не зависит от генерации или концентрации дендримера (рисунок 33). Такое поведение свидетельствуют о том, что положение триптофановых остатков не изменяется под воздействием дендримеров, а значит взаимодействие с дендримерами не приводит к частичному разворачиванию белковой молекулы. Полученные данные соответствуют результатам спектроскопии КД.

2.3.6 Изучение стабильности комплексов дендримера с прионным белком

Эффект тушения флуоресценции триптофана белке при В взаимодействии с дендримерами был положен в основу изучения стабильности полученных комплексов. Электростатическое взаимодействие ослабевает с увеличением ионной силы раствора, поэтому последовательное добавление хлорида натрия к комплексам прионный белок-дендример должно сопровождаться их диссоциацией, и, как следствие, ростом флуоресценции триптофана. Однако, как ЭТО видно кривых ИЗ флуориметрического титрования раствором хлорида натрия эквимольных смесей прионного белка с дендримерами (Рисунок 35), ни для одного из наблюдалось изученных дендримеров не значительного увеличения флуоресценции, соответствующего разрушению комплекса. Наибольший рост флуоресценции наблюдался для G2, однако он составил лишь 10 % от исходного значения. В случае G3 и G4 рост флуоресценции не превысил 5%, а дальнейшее увеличение концентрации NaCl также не привело к изменению хода кривых.



Рисунок 35 - Кривые флуориметрического титрования комплексов прионный белок-дендример раствором NaCl

Разрушить комплексы не удалось конкурентной реакцией при взаимодействии с противоположно заряженным полимером - декстран сульфатом с молекулярной массой 15 кДа. Добавление декстран сульфата привело к постепенному увеличению гидродинамического диаметра частиц и возникновению крупных агрегатов (Рисунок 36). По всей видимости, такое поведение объясняется сорбцией молекул полианиона на поверхности существующих комплексов и формированием тройного комплекса – сульфат-дендример-прионный белок. Вместе, декстран ЭТИ данные значительный вклад гидрофобных указывают на взаимодействий В стабильность комплексов, который обеспечивается наличием в молекуле дендримера фениленовых фрагментов.





Рисунок 36 - Гидродинамические диаметры комплексов прионного белка с дендримерами второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций при добавлении декстран сульфата (DS)

Таким образом, катионные пиридилфениленовые дендримеры способны формировать прочные комплексы с овечьим прионным белком. Согласно результатам изотермической титрационной калориметрии и моделирования методом молекулярной динамики, движущей силой взаимодействия являются электростатические силы, однако гидрофобные взаимодействия обуславливают также вовлечены в связывание И экстремальную стабильность комплекса. При этом связывание дендримеров с белком не значительного оказывает влияния на его вторичную структуру, ЧТО подтверждается результатами КД спектроскопии, экспериментами ПО тушению собственной флуоресценции белка и данными моделирования. Данные изотермической титрационной калориметрии выявили меньшее значение теплового эффекта наряду с большей константой связывания для G3 по сравнению с G2, что указывает на рост вклада гидрофобных взаимодействий с увеличением генерации дендримера. Несмотря на меньшее количество молекул G3, способных связаться с белком, по сравнению с G2, он оказывает большее влияние на белковую молекулу, и комплекс G3-прионный белок проявляет еще бОльшую стабильность при действии хлорида натрия, что также соответствует рассчитанным с помощью изотермической титрационной калориметрии константам связывания. Кроме того, рост рассчитанных констант Штерна-Фольмера с ростом генерации указывает на возрастающую силу и эффективность взаимодействия дендримеров с белком.

Краткие выводы по главе следующие:

1. Молекула овечьего прионного белка обладает двумя сайтами, доступными для связывания дендримеров, - один в основной цепи и один, расположенный в боковой цепи. Сайты несут отрицательный заряд. При этом прионный белок способен одновременно связать до 4 молекул G2, и не более 2 молекул G3.

2. Благодаря наличию в структуре дендримеров фениленовых групп, гидрофобные взаимодействия также вовлечены в связывание.

3. Вклад гидрофобных взаимодействий растет с ростом генерации.

4. Более выраженные гидрофобные взаимодействия ведут к более эффективному связыванию дендримеров с белком и играют решающее значение в выдающейся стабильности комплекса.

2.4 ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ДЕНДРИМЕРОВ ПРЕПЯТСТВОВАТЬ БЕЛКОВОЙ АГРЕГАЦИИ

2.4.1 Влияние дендримеров на процесс формирования олигомеров приона

Известно, что формирование олигомеров прионного белка происходит при нагревании в определенных условиях из-за его частичного разворачивания и появления термодинамически неустойчивой формы, стремящейся к агрегации [184]. На предыдущем этапе работы было показано, что дендримеры связываются с нативной мономерной формой прионного белка [237]. Следовательно, дендримеры могут препятствовать амилоидной олигомеризации, формируя комплексы либо с нативным белком, либо с его развернутой формой [243].

Для того чтобы оценить влияние дендримеров на олигомеризацию приона, к нативному раствору белка с концентрацией 40 µM добавляли растворы дендримеров до достижения заданной концентрации (100 и 200 µM). Пробы термостатировали при 65 °C в течение 150 мин, после чего проводили анализ [243].

Прежде всего, влияние дендримеров на процесс формирования прионных олигомеров было оценено с помощью ДЛС.

Анализ методом ДЛС показал, что инкубирование прионного белка при 65 °C в течение 150 минут в отсутствии дендримера приводит к формированию олигомеров с гидродинамическим диаметром 21 нм (Рисунок 37). При этом размер нативного приона равен 4,0 нм. Существенных изменений размеров частиц при добавлении к прионному белку дендримера второй генерации обнаружено не было (Рисунок 37, а). Дендример третьей генерации оказывал выраженное влияние и предотвращал образование олигомеров. Размер образовавшихся частиц (13 нм) оказался меньше, чем

контрольных олигомеров, но больше чем размеры мономеров (Рисунок 37, б). Вероятно, в этом случае образуются комплексы мономеров прионого белка дендримером, ЧТО препятствует формированию обычных С амилоидных олигомеров приона. В случае дендримера четвертой генерации (Рисунок 37, в) размер комплекса белка с дендримером оказался больше, чем в случае контрольных олигомеров, однако, дендример четвертой генерации склонен к формированию ассоциатов размером 32 нм в растворе. Кроме того, дендример четвертой генерации может связывать одну или несколько молекул мономера прионного белка, образуя достаточно крупные частицы. По этой причине сложно на основании только этих данных ДЛС судить о его влиянии на процесс формирования белковых олигомеров. При этом следует отметить, что без инициации олигомеризации с нативным прионным белком дендримеры формируют комплексы размером 7, 7,5 и 18 нм для G2, G3 и G4, соответственно (Рисунок 30).





Рисунок 37 – Объемное распределение гидродинамических диаметров олигомеров приона (красные линии), а также комплексов, полученных при ингибировании олигомеризации приона дендримерами второй (А), третьей (Б), и четвертой генераций (В). Для того чтобы оценить влияние дендримеров на олигомеризацию приона, пробы, содержащие прионный белок и дендример в концентрации 100 (фиолетовые линии) или 200 (зеленые линии) µM, инкубировали при 65 °C в течение 150 минут

Как отмечалось в литературном обзоре, формирование олигомеров сопровождается структурным переходом α-спирали в β-складки. Изменения, происходящие во вторичной структуре белка, отслеживались с помощью спектроскопии кругового дихроизма (Рисунок 38). Нативный прионный белок первоначально демонстрировал преобладание альфа-спиральной структуры, на что указывает наличие минимума при 210 нм с последующим наростанием молярной эллиптичности (Рисунок 38, красные линии). Термическая дестабилизация при 65 °С в течение 150 мин привела к возникновению одного минимума при 216 нм, типичного для бета-(Рисунок 38, черные линии). Добавление же складчатой структуры дендримеров повлияло на характер изменения кривой. После инкубации приона с дендримерами спектры демонстрировали присутствие смешанной α/β структуры. Результаты были одинаковы для всех генераций дендримера и не изменились с увеличением концентрации дендримера.





Рисунок 38 – Влияние дендримеров в концентрации 100 (А) и 200 (Б) μМ на изменение вторичной структуры прионного белка в ходе его олигомеризации. На рисунке представлены спектры кругового дихроизма нативного прионного белка (красные линии), прионных олигомеров (черные линии), а также комплексов с дендримерами второй (зеленые линии), третьей (синие линии) и четвертой (фиолетовые линии) генераций, полученных при инкубировании прионного белка с дендримерами в условиях формирования олигомеров (65 °C, 150 минут).

Образование прочных комплексов между прионным белком и дендримерами в процессе термоагрегации было детектировано с помощью электрофореза по Лэммли (рисунок 39).



Рисунок 39 – Электрофорез по Лэммли продуктов взаимодействия прионного белка с катионными пиридилфениленовыми дендримерами при инкубировании в течение 150 мин при 65 °C. (1) Белки-маркеры; (2) олигомеры PrP, полученные в отсутствие дендримеров; (3) PrP + G2 в концентрации 100 μ M; (4) PrP + G3, 100 μ M; (5) PrP + G4, 100 μ M; (6) G2; (7) G3; (8) G4; (9) PrP + G2, 200 μ M; (10) PrP + G3, 200 μ M; (11) PrP + G4, 200 μ M

При электрофоретическом анализе проб было обнаружено, что после инкубации в денатурирующих условиях в присутствии додецил сульфата натрия происходит разрушение олигомерных форм приона, при этом доминирующей составляющей является мономерный белок с ММ=23кДа, и небольшое количество димеров белка (рисунок 39, дорожка 2). В пробах, полученных в условиях термоагрегации приона в присутствии дендримеров, были обнаружены новые соединения с молекулярной массой 60-80 кДа в зависимости от генерации дендримера (рисунок 39, дорожки 3-5 и 9-11), которые отсутствовали в контрольных пробах, содержащих только прионный белок, либо дендримеры. Очевидно, что эти соединения соответствуют комплексу белок-дендример. В пробах также присутствовали свободный прионный белок и дендример. Тем не менее, их наличие может быть вызвано конкурентной реакцией с ДДС натрия в условиях кипения, приводящей к высвобождению дендримера и белка из комплекса.

Таким образом, термическая дестабилизация прионного белка привела к формированию олигомеров, чья вторичная структура представлена в основном бета-складками (рисунок 38, черные линии), с диаметром 21 нм. Добавление дендримеров привело к формированию комплексов дендримера с белком для всех трех генераций. Однако формирование комплексов само по себе недостаточно для того, чтобы предотвращать агрегацию белка. Анализ КД спектров показал, что все дендримеры эффективно препятствовали образованию бета-складчатых структур и, следовательно, предотвращали формирование амилоидных олигомеров. Принимая во внимание результаты ДЛС, действие дендримеров все же отличалось в зависимости от генерации. G3 наиболее явно предотвратил формирование прионных олигомеров, что подтверждается данными и ДЛС, и спектроскопии КД. G2 и G4, вероятно, также препятствуют образованию олигомерных форм приона. При этом они, безусловно, связываются с ним и ингибируют формирование бета-структур. Увеличение концентрации не привело к изменению эффекта. Тем не менее, полученные комплексы были стабильны и не подвержены дальнейшей агрегации, что подтверждается данными ДЛС, в течение 7 дней.

Таким образом, дендримеры способны удерживать прионный белок от патологической трансформации. Очевидно, что для того чтобы соединение обладало подобными свойствами, важным является то, как именно оно связывается с белком. Построенная модель взаимодействия дендримеров с нативным прионным белком показывает (рисунок 27), что связывание дендримеров затрагивает участок 190–200, который вовлечен в процесс амилоидной трансформации белка. Настоящее исследование продемонстрировало, что это связывание имеет решающее значение для способности дендримеров предотвращать структурный переход альфа-

спирали в бета-складки, который ответственен за возникновение олигомеров и амилоидных фибрилл.

Стоит отметить, что в нашем случае исследования проводились при нейтральном значении pH, в то время как ни в одной из предыдущих работ дендример не проявлял анти-прионных свойств при таком значении pH [37, 211, 213]. Напротив, низкое значение pH считалось необходимым условием для ингибирования фибриллизации приона, либо разрушения амилоидных агрегатов дендримерами *in vitro*. При этом стоит отметить, что характер и эффективность взаимодействия дендримеров с белком при низких значениях pН существенно отличаются от взаимодействий, возникающих при нейтральных значениях, так как заряд наиболее часто используемых полиаминных дендримеров сильно зависит от pH [132, 231]. Кроме того, было предположено, что кислая среда не только увеличивает заряд дендримера, она также вызывает структурные изменения в белке, которые помогают дендримеру наиболее эффективно взаимодействовать с белком и дестабилизировать его [37]. Пиридилфениленовые дендримеры же, в свою способны ингибировать агрегацию очередь, оказались приона при нейтральном значении рН среды. Таким образом, эти соединения могут быть активны в любом отделе клетке, и их действие не будет ограничено только органеллами, обладающими кислым значением pH.

2.4.2 Ингибирование фибриллизации прионного белка

Ha следующем этапе исследования были расширены И было обнаруженный эффект влиять также на протестировано, сможет ЛИ формирование фибрилл амилоидных приона [243]. Формирование амилоидных фибрилл индуцировалось добавлением гуанидин гидрохлорида

к смеси прионного белка с дендримерами и инкубированием при 37 °С и постоянном перемешивании в течение 70ч.

2.4.2.1 Флуоресценция Тиофлавина Т

Способность дендримеров ингибировать процесс фибриллизации белка была оценена путем измерения флуоресценции тиофлавина Т. Это хорошо известный метод, позволяющий детектировать наличие амилоидных структур, так как интенсивность флуоресценции тиофлавина значительно возрастает при взаимодействии с бета-складками. Как видно из рисунка 40, фибриллы приона демонстрировали сильную флуоресценцию (красные линии), в то время как спектры флуоресценции проб, полученных в присутствии дендримеров (голубые и зеленые линии), показали значительное уменьшение интенсивности по сравнению с контрольными фибриллами, что говорит об эффективном ингибировании процесса.



Рисунок 40 – Спектры флуоресценции тиофлавина Т прионных фибрилл в отсутствии дендримеров (красные линии) и в присутствии дендримеров второй (А), третьей (Б) и четвертой (В) генераций в концентрации 100 µМ

(синие линии) и 200 µМ (зеленые линии). Формирование амилоидных фибрилл индуцировалось добавлением гуанидин гидрохлорида к смеси приона с дендримерами и инкубированием при 37 °C и постоянном перемешивании в течение 70ч. Контрольные фибриллы были получены в аналогичных условиях без добавления дендримеров.

Анализ относительных интенсивностей флуоресценции Тиофлавина Т (Рисунок 41) показал, что G3 был более активен, чем G2. Однако переход к G4 не показал аналогичной зависимости. Напротив, значения относительной флуоресценции тиофлавина для G4 были больше, чем для G3, указывая на меньшую степень ингибирования процесса. Данные говорят о том, что, с одной стороны, высокий заряд, а также плотность поверхностных функциональных групп положительно влияют на способность дендримеров предотвращать белковую агрегацию. С другой стороны, необходим баланс между зарядом молекулы и ее размером. Наименьшее же значение флуоресценции, что соответствует наибольшей степени ингибирования процесса, достигалось при действии третьей генерации дендримера в концентрации 200 µМ.



Рисунок 41 – Диаграмма относительных интенсивностей флуоресценции тиофлавина Т после инкубирования прионного белка с 107

пиридилфениленовыми дендримерами различных генераций при 37 °C в течение 70ч. F соответствует значению интенсивности флуоресценции тиофлавина T при длине волны 480 нм пробы, полученной в присутствии дендримеров; F_0 – интенсивность флуоресценции тиофлавина T в присутствие контрольных прионных фибрилл при той же длине волны.

2.4.2.2 Восприимчивость комплексов прионного белка с дендримерами к действию протеазы К

Известно, что фибриллы приона устойчивы к действию клеточных протеаз, поэтому восприимчивость к протеолизу может служить дополнительным доказательством предотвращения формирования амилоидных фибрилл. С этой целью пробы, полученные в процессе фибриллизации прионного белка в присутствии дендримеров, подвергли протеолизу в течение 5 и 10 мин, после чего идентифицировали полученные соединения с помощью электрофореза. Как видно из рисунка 42, нативный белок чувствителен к действию протеазы К, так как в пробе присутствуют соединения низкого молекулярного веса, а полоса, соответствующая прионному белку (23 кДа), исчезла в ходе протеолиза. Контрольные фибриллы разрушались под воздействием додецилсульфата натрия во время гель-электрофореза, однако сохраняли устойчивость к протеолизу. Пробы, полученные в присутствии дендримеров, оказались чувствительны к протеолизу и полоса, соответствующая приону, практически пропала спустя 10 минут протеолиза при обработке G2 и G3. В случае G4 прионный белок оказался подвержен протеолизу, однако, полоса, соответствующая белку, была все же отчетливо видна по окончании эксперимента. Это может быть вызвано стерическими препятствиями, так как G4 имеет наибольший размер ограничивать доступность сайтов для действия протеазы. И может Полученные результаты находятся в соответствии с данными тиофлавиновой
флуоресценции, доказывая, что дендримеры способны ингибировать амилоидную агрегацию прионного белка.



42 Устойчивость Рисунок препаратов, полученных процессе В фибриллизации прионного белка при добавлении пиридилфениленовых дендримеров или без них (контрольные пробы), к протеолизу. После фибриллизации пробы обрабатывали протеиназой К в течение 5 и 10 минут, контрольные пробы (t₀) отбирали до добавления протеазы. Восприимчивость проб к протеолизу оценивали электрофорезом по Лэммли. Пробы показаны на дорожках в следующем порядке: рисунок А соответствует контрольным фибриллам прионного белка до добавления протеиназы К (1), а также после 5 (2) и 10 (3) минут протеолиза, необработанный протеиназой К нативный прионный белок (4), после добавления к нему протеазы в течение 5 (5) и 10 (6) минут; контрольный G2 (7), а также пробы, полученные после фибриллизации приона с G2 (8-10). На рисунке Б показаны результаты протеолиза проб, полученных в процессе фибриллизации прионного белка в присутствии G3 (2-4) и G4 (6-8), а также контрольные дендримеры (1 и 5).

Эксперименты по протеолизу продемонстрировали, что ингибирование фибрилизации прионного белка с помощью дендримеров приводит к формированию структур, которые чувствительны к действию протеиназы К в отличие от контрольных фибрилл, полученных в отсутствии дендримера. Результаты позволяют предположить, что помимо собственной способности дендримеров ингибировать агрегацию белка, другие клеточные механизмы также могут быть вовлечены в этот процесс в *in vivo* условиях, дополняя действие дендримеров.

2.4.2.3 Исследование конвертирующей способности комплексов прионного белка с дендримерами с использованием затравки фибрилл

Интересной особенностью прионов является способность неправильно свернутых прионных молекул вызывать аналогичную трансформацию нормального клеточного прионного белка, что приводит к прогрессированию заболевания. Поэтому крайне важным при ингибировании фибриллизации приона является отсутствие конвертирующей способности у сформировавшихся комплексов прионного белка с дендримером. Это свойство было определено методом "seeding" – агрегации с использованием затравки фибрилл.

На первом этапе проводился процесс фибриллизации прионного белка в присутствии дендримера, который, как было показано ранее, ингибирует этот процесс за счет формирования комплекса с прионом. Затем полученные комплексы были отделены от реакционной смеси, отмыты от несвязавшегося дендримера и добавлены в качестве затравки к раствору нативного прионного белка. После чего повторяли процесс фибриллизации. В качестве контроля служила затравка прионного белка, полученная в процессе агрегации в отсутствие дендримера. Анализ проводился путем измерения флуоресценции тиофлавинаТ. Эффективность ингибирования (ЭИ) оценивалась по следующей формуле:

 $\Im H = 1 - F/F_0$, где F – максимум интенсивности флуоресценции пробы, содержащей комплекс прионного белка с дендримером в качестве затравки, F₀ – максимум интенсивности флуоресценции контрольной пробы.

На рисунке 43 изображены изменения флуоресценции тиофлавина Т в присутсвии и отсутсвии (контрольные пробы) комплексов дендримеров в различных концентрациях с прионным белком. Как это видно из спектров, добавление дендримеров даже в таких низких концентрациях, как 5 и 10 µM фибриллизации белка, значительно снижало интенсивность на этапе флуоресценции по сравнению с контрольной пробой. Наибольшее влияние на процесс оказывал G4, который ингибировал фибриллизацию под действием затравок фибрилл даже в концентрации 1 µМ (Рисунок 43, В). Увеличение концентрации закономерно ведет к большей эффективности ингибирования, которая достигает практически 90 % при использовании 200 µМ дендримера. Результаты указывают на отсутствие конвертирующей способности у комплексов дендримера с прионным белком, так как они не вызывают патологической трансформации нативного прионного белка в неправильно свернутую форму. Важно, что в данном типе эксперимента агрегация не стимулируется термической обработкой или воздействием хаотропного агента, как было в опытах по получению олигомеров и фибрилл, соответственно. Напротив, агрегация прионного белка, активированная затравкой фибрилл, происходит наиболее естественным образом, а значит наблюдаемый от дендримеров эффект «защиты» прионного белка крайне значим для понимания развития этой патологии.

111





Рисунок 43 - Влияние дендримеров второй (А), третьей (Б) и четвертой (С) генераций на агрегацию прионного белка, индуцированную затравкой фибрилл. Для того чтобы оценить способность комплексов вызывать конформационные изменения и агрегацию нативного прионного белка, полученные на этапе фибриллизации комплексы белка с дендримерами были добавлены в качестве затравки к нативному прионному белку, после чего пробы инкубировали при 37 °С и пермешивании. За процессом следили измерением флуоресценции тиофлавина Т. Концентрация, указанная в рамке, соответсвует концентрации дендримера, использованной на этапе фибриллизации белка.

Для того чтобы предположить механизм воздействия дендримеров на амилоидную агрегацию приона, необходимо учитывать последовательный характер этого процесса. Так, лиганды, связывающиеся с белком, могут стабилизировать нативное состояние и предотвращать разворачивание белковой молекулы, удерживать частично развернутую молекулу от дальнейшей агрегации, стабилизировать олигомеры, блокировать концы растущих фибрилл зародышей, И ИХ a также разрушать уже сформировавшиеся фибриллы [205]. Скорее всего, действие дендримеров сочетает в себе несколько из указанных путей. Дендримеры предотвращали структурную конверсию прионного белка, снижая, тем самым, концентрацию белка, способную к формированию фибрилл, и блокируя процесс еще до формирования амилоидных олигомеров. Они также предотвращали формирование зрелых амилоидных фибрилл. Учитывая рост флуоресценции тиофлавина Т, которая была все же ниже флуоресценции контрольных проб, дендримеры могут связывать и инактивировать олигомеры и блокировать концы растущих фибрилл.

В данной части исследования обнаружено, что дендримеры способны предотвращать как формирование небольших, но наиболее токсичных амилоидных агрегатов – олигомеров, так и зрелых амилоидных фибрилл [243].

- Согласно данным спектроскопии КД, дендримеры препятствовали структурной конверсии приона, приводящей к появлению бета-складок, при формировании олигомеров;

- результаты измерения флуоресценции тиофлавина Т показали уменьшение содержания амилоидных структур в пробах, содержащих дендример, по сравнению с контрольными пробами без дендримеров;

- эксперименты по чувствительности к действию протеиназы К продемонстрировали восприимчивость к протеолизу структур, полученных при обработке дендримерами, в отличие от контрольных фибрилл;

- комплексы дендримеров с прионом не вызывали последующей амилоидной трансформации нативного приона при запуске процесса фибриллизации.

ингибирование олигомеризации Таким образом. было вызвано сайтом, связыванием дендримеров с вовлеченным В амилоидную трансформацию прионного белка, и формированием прочных комплексов дендример-прионный белок. Это взаимодействие в дальнейшем блокировало более глубокую агрегацию – формирование амилоидных фибрилл. Эффект зависел от генерации дендримера и дендример третьей генерации оказался наиболее активным. Примечательно, что дендримеры сохраняли свой «защитный» эффект вне зависимости от условий агрегации, а также были активны при нейтральном значении среды, что говорит о том, что структурные свойства дендримеров, а именно постоянство заряда и жесткость, играют важную роль в проявлении анти-амилоидных свойств [243].

2.5 РАЗРУШЕНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ АМИЛОИДНОЙ ПРИРОДЫ

Как литературном обзоре, нейродегенеративные отмечалось В заболевания сопровождаются появлением в межклеточном матриксе нервных фибрилл. Представлялось разумным исследовать тканей амилоидных способность катионных пиридилфениленовых дендримеров разрушать белковые агрегаты амилоидной природы. Анализ был проведен на примере телец включения (ТВ) овечьего прионного белка и дендримеров трех генераций. Тельца включения представляют собой нерастворимые амилоидные агрегаты [244, 245], однако, процедура их очистки и выделения менее трудозатратна, чем выделение чистого белка и его фибриллизация.

Мы предположили, что инкубация ТВ с дендримерами должна приводить к частичному растворению белковых агрегатов за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий с дендримерами и к

115

переходу образующихся комплексов в растворимое состояние. После совместной инкубации ТВ прионного белка с различными дендримерами при 37°С и постоянном перемешивании был проведен анализ образующихся комплексов различными методами. Для отделения комплексов пробы после инкубации центрифугировали в условиях, подобранных таким образом, чтобы растворимые комплексы небольшого размера оставались в растворе, в то время как оставшиеся нерастворенными тельца включения осаждались.

2.5.1 Электрофорез по Лэммли

При электрофоретическом анализе проб (рисунок 44) было показано, что после инкубации В денатурирующих условиях в присутствии TB. додецилсульфата натрия происходит разрушение Основным компонентом разрушенных ТВ является прионный белок с молекулярной массой порядка 23 кДа и некоторое количество димерных форм с более высокой молекулярной массой (дорожка 1). В супернатанте, полученном после центрифугирования ТВ в тех же условиях, что и пробы, отсутствуют какие-либо белковые полосы (дорожка 2). После инкубации ТВ с G2 никаких новых частиц в супернатанте не появляется, поскольку на дорожке 4 присутствует только одна полоса, соответствующая самому дендримеру (дорожка 3). Однако в супернатантах, полученных после инкубирования ТВ с G3 и G4, отчетливо видна полоса с высокой молекулярной массой (дорожки 6 и 8), которая даже не входит в разделяющий гель и отсутствует в контрольных пробах, содержащих только дендример или ТВ. Поэтому можно предположить, что эта полоса соответствует комплексу высвободившегося в раствор прионного белка и дендримера. Особо следует отметить, что полученный комплекс не разрушается в присутствии додецил сульфата

116

натрия (в отличие от самих TB), что указывает на высокую прочность взаимодействия дендримеров с прионным белком.



Рисунок 44 – Электрофорез по Лэммли продуктов взаимодействия ТВ PrP с катионными пиридилфениленовыми дендримерами. (1) – суспензия ТВ после обработки сэмпл буфером при 95 °C в течение 5 минут; (2) – супернатант ТВ без обработки дендримерами; (3) - G2; (4) – супернатант пробы, полученной после инкубации ТВ с G2 в концентрации 100 μ M; (5) – G3; (6) - супернатант пробы, полученной после инкубации TB с G3 в концентрации 100 μ M; (7) – G4; (8) - супернатант пробы, полученной после инкубации TB с G4 в концентрации 100 μ M; (9) – белки-маркеры. ТВ овечьего PrP инкубировали с дендримерами при 37 °C и непрерывном перемешивании в течение 21 ч, затем пробы центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин.

2.5.2 Иммунохимическое детектирование белка

Для подтверждения белковой природы полученных комплексов ТВ и дендримеров иммунохимическими методами анализа была проведена

белка идентификация прионного помощью специфических С моноклональных антител против овечьего приона. Прежде всего, для пробы с дендримером G3, добавленным в концентрации 0.1 мМ, был проведен точечный иммуноблоттинг (рисунок 45). Антитела к прионному белку эффективно взаимодействовали с образцами суспензии прионного белка (точка 1) и чистого прионного белка (точка 3), о чем свидетельствует характерное синее окрашивание. Супернатант, полученный при центрифугировании ТВ, в таких же условиях, что и опытные пробы (10 мин, 6000 об/мин), не содержал взаимодействующих с антителами компонентов (в пробе 2 окрашивание отсутствовало). В тоже время, как видно из рисунка 45 (точка 5), супернатант полученный после инкубирования ТВ овечьего прионного белка вместе с G3 окрасился антителами к прионному белку характерным синим цветом. Эти эксперименты подтверждает присутствие приона в комплексе, перешедшим в раствор. Однако, следует отметить, что сам дендример дает желто-коричневое окрашивание (точка 4) и может затруднять визуализацию антител. Аналогичные результаты были получены с дендримером G4.



Рисунок 45 - Точечный иммуноблоттинг ТВ PrP (1); супернатант ТВ без обработки дендримерами (2); PrP ARR контроль (3); G3 контроль 100 μM (4); супернатант ТВ, инкубированных вместе с G3 100 μM (5). 20 μл каждой пробы помещали на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали мышиными моноклональными анти- PrP антителами 66.100b3.

Для более аккуратной идентификации прионного белка был проведен вестерн блоттинг после электрофоретического разделения комплексов PrP с

дендримерами. Пробы, содержащие суспензию ТВ и комплексы прионного белка с дендримерами, подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях, а затем проводили электроперенос белков с акриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану для иммунохимической визуализации PrP. Электроперенос прионного белка и маркеров на нитроцеллюлозную мембрану эффективно проходил в стандартных условиях (45 мин). Однако, ни при стандартном, ни увеличенном до 2 часов электропереносе полоса, соответствующая комплексу белка с дендримером, не была обнаружена. Для электропереноса комплекса PrP с дендримерами потребовалось 5 часов. Приведенные на рисунке 46 данные показывают, что антитела против PrP взаимодействуют с основным компонентом ТВ – прионным белком, а также с минорными компонентами – димерами и фрагментами PrP (дорожка 2). В супернатанте, полученном после осаждения ТВ, прионный белок отсутствует (дорожка 4). После инкубации ТВ с G3 в супернатанте была обнаружена только одна полоса, идентифицируемая с помощью антител к PrP (дорожка 3), представляющая собой комплекс приона с дендримером. Дендример не взаимодействует с антителами и дает желто-коричневое окрашивание (дорожка 5). Аналогичные результаты были получены с G4. Таким образом, проведенные эксперименты показывают, что комплексы, содержащиеся в растворе после совместного инкубирования ТВ и дендримеров, содержат прионный белок.



Рисунок 46 – Вестерн-блоттинг (1) – Белки-маркеры (260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20 кДа); (2) – Суспензия ТВ PrP; (3) – супернатант ТВ PrP после инкубирования с G3; (4) супернатант ТВ PrP без обработки дендримером; (5) - G3

2.5.3 Динамическое лазерное светорассеяние

С целью оценки размеров образующихся комплексов прионного белка с дендримерами супернатант был проанализирован методом динамического светорассеяния: разрушение ТВ должно проявляться в возникновении частиц значительно меньшего размера по сравнению с исходными ТВ. Из приведенных на рисунке 47 данных следует, что при концентрации дендримера в пробе равной 100 µM дендримеры G3 и G4 привели к разрушению нерастворимых ТВ и появлению комплексов малого размера: 10 нм для G3 и 24 нм для G4. Использование же G2 в этой концентрации не привело к возникновению небольших комплексов, детектируемых с помощью ДЛС. Очевидно, что такое поведение вызвано недостатком положительного заряда, необходимого для эффективного растворения ТВ, т.к. дендример несет только 15 положительных зарядов. При этом G3 несет 50 положительных зарядов, а G4 - 115. Таким образом, чем выше генерация дендримера и, соответственно, его заряд, тем выше его способность к растворению белковых агрегатов. Увеличение концентрации дендримера до 1 мМ позволило получить растворимые комплексы дендримера с белком для

всех 3х протестированных соединений, а при уменьшении концентрации до 0,01 мМ практически все дендримеры, за исключением G3, оказались не эффективны.



121

Рисунок 47 – Объемное распределение гидродинамических диаметров комплексов PrP-дендример, полученных после инкубации TB PrP с G2 (A), G3 (Б) и G3 (В). Красными линиями изображены гидродинамические диаметры контрольных дендримеров, зелеными и фиолетовыми – супернатанты проб, полученных после инкубации TB с дендримерами в концентрации 100 µM и 0,1 мM, соответственно.

Меньший размер комплексов G4 с белком по сравнению с чистым дендримером может быть объяснен склонностью данного дендримера образовывать агрегаты в водном растворе за счет возросшей степени гидрофобности. Анализ полученных комплексов методом ДЛС в течение 5 дней обнаружил, что комплексы не были подвержены повторной агрегации в исследуемом промежутке времени.

Как и ранее, дендримеры были активны в условиях, близких к физиологическим. При этом использование ППИ и ПАМАМ дендримеров четвертой генерации не оказывало существенного влияния на агрегаты прионного белка *in vitro* при pH = 7,0 [211, 213, 228]. Данные указывают на то, что структурные свойства дендримеров, а именно их жесткость и постоянство заряда, играют важную роль в их способности разрушать белковые агрегаты.

2.5.4 Определение концентрации высвободившегося белка методом иммуноферментного анализа

Таким образом, было установлено, что обработка дендримерами ТВ приводит к переходу в раствор очень прочных комплексов PrP-дендример, которые не разрушаются даже в присутствии додецилсульфата натрия. Для

того чтобы оценить количество высвободившегося в виде комплексов с дендримерами белка, был использован анализ ELISA. Стандартный спектроскопический анализ оказался в данном случае непригодным: комплексы сложные, неканонические, дендример дает сильное поглощение и его вклад довольно сложно учитывать, поэтому метод не дал адекватных результатов. С целью количественной оценки полученных результатов был использован иммуноферментный анализ, В которого основе лежит Таким специфическая реакция антиген-антитело. образом, оказалось возможным однозначно судить о концентрации белка, избежав ошибок, неминуемо возникающих при использовании спектроскопических методов: антитела связываются только с белком и не связываются с дендримером.

Анализ был проведен для пробы, содержащей G3 в концентрации 0,1 мМ. Оказалось, что концентрация белка, высвободившегося в раствор после обработки ТВ дендримером, равна 6 µг/мл. Исходное количество белка в пробе – 0,75 мг/мл. Результаты схематически представлены на рисунке 48. Стоит отметить, что количество растворенного белка зависит OT соотношения дендримера к белку, а также от исходного количества белковых агрегатов. Чем больше дендримера по отношению белку, тем больше будет степень растворения агрегатов. Кроме того, опыт с повторной инкубацией показал, что таким образом можно выделить дополнительно практически такое же количество белка. С этой целью, оставшиеся нерастворенными инкубации с дендримером ТВ были отделены от раствора после центрифугированием, а затем снова проинкубированы с дендримером по методике, описанной выше. Супернатант был отделен и проанализирован с помощью ДЛС и ELISA, которые выявили присутствие комплексов белка с дендримером, а ELISA анализ показал, что в раствор удалось высвободить практически такое же количество белка – 5,8 µг/мл

123



Рисунок 48 – Схематическое представление результатов анализа методом ELISA количества высвободившегося в раствор белка из ТВ под дейсвтием дендримера. Голубой столбик – поглощение контрольного PrP ARR в концентрации 6 μг/мл; красный столбик – поглощение комплекса PrPдендример, перешедшего в раствор после взаимодействия TB с G3 в концентрации 100 μM; зеленая колонка – поглощение супернатанта TB без обработки дендримером, используемое в качестве контроля.

2.5.5 Флуоресценция тиофлавина Т

Для оценки влияния дендримеров на амилоидные свойства ТВ был использован бензотиазольный краситель тиофлавин Т. Супернатант проб, в которых, согласно данным ДЛС, произошло высвобождение белка в раствор, был проанализирован измерением флуоресценции тиофлавина Т. Как видно из рисунка 49, спектры флуоресценции тиофлавина Т в присутствии анализируемых проб показывают значительное уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с флуоресценцией ТВ без обработки дендримером, что, очевидно, свидетельствует об уменьшении содержания амилоидных структур. При увеличении концентрации дендримера до 1 мМ спектр содержал слишком высокий уровень шума. В то же время, увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с нативным прионом может указывать на переход в растворимый комплекс не единичной молекулы белка, а нескольких молекул, частично сохраняющих бета-складчатую структуру.





Рисунок 49 – Спектры флуоресценции тиофлавина Т в присутствии ТВ (голубые линии), дендримеров (фиолетовые линии), комплексов приондендример (зеленые линии), полученных в условиях инкубации ТВ с G2 (A), G3 (Б) и G4 (В). Контрольные спектры ТВ и дендримеров снимали в концентрациях, соответствующих их содержанию в пробе.

2.5.6 Флуоресцентная микроскопия

Влияние дендримеров на ТВ было исследовано также с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием тиофлавина S (Рисунок 50). Видно, что после обработки дендримерами ТВ становятся более «рыхлыми»: дендример сорбируется на их поверхности, увеличивая расстояния между отдельными элементами ТВ, что, вероятно, и приводит в итоге к отщеплению фрагментов ТВ и их переходу (в комплексе с дендримерами) в растворимое состояние.





Рисунок 50 – Флуоресцентные микрофотографии ТВ PrP, окрашенных тиофлавином S без обработки дендримером (а), после взаимодействия с G3 (б) и G4 (в)

Таким образом, общая картина взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с ТВ овечьего прионного белка выглядит следующим образом. Сначала под действием электростатических И гидрофобных взаимодействий происходит сорбция молекул дендримера на поверхности агрегатов, в результате чего происходит их разрыхление с последующим высвобождением в раствор комплекса белка с дендримером (Рисунок 51) [246].



Рисунок 51 – Схематическое изображение действия катионных пиридилфениленовых дендримеров на тельца включения овечьего прионного белка, приводящего к высвобождению в раствор комплексов дендримеров с белком

Таким образом, в данной части исследования показано, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны разрушать белковые агрегаты амилоидной природы, приводя к высвобождению в раствор растворимых комплексов белок-дендример [246]. За счет жесткой структуры дендримера, а также постоянству заряда разрушение эффективно происходило при физиологическом значение pH = 7,4. Способность разрушать белковые

агрегаты возрастала с номером генерации и, как следствие, заряда дендримера. Кроме того, полученные комплексы не были подвержены повторной агрегации в течение последующих пяти дней, согласно результатам ДЛС [246]. Так как заряженными единицами дендримеров являются кватернизованные пиридильные звенья, данные макромолекулы могут быть использованы в широком диапазоне pH и их действие на амилоидные агрегаты при этом будет оставаться неизменным.

2.6 ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ДЕНДРИМЕРОВ

Цитотоксичность дендримеров была измерена с помощью МТТ анализа на двух линиях клеток: нейробластомы и меланомы (Рисунок 52). МТТ анализ основан на способности живых клеток восстанавливать растворимый бромид 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]5-дифенилтетразолия (МТТ) в пурпурноголубые кристаллы формазана. Неживые клетки такой способностью не обладают.

Клетки обрабатывали возрастающими концентрациями дендримеров. При этом токсичность возрастала с ростом генерации, и G4 обладал наибольшей токсичностью. ЛД₅₀ равнялись 9, 5, 4 µM для G2, G3 иG4, соответственно. Соединения обладали практически одинаковой токсичностью для обеих клеточных линий.

129



Рисунок 52 – Цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров. Выживаемость клеток меланомы MellL (A) и нейробластомы SH-SY5Y (Б). Процент выживших клеток был нормализован с использованием необработанного контроля.

Дендримеры демонстрировали меньшую токсичность по сравнению с часто используемыми ПАМАМ и ПЭИ дендримерами, по всей видимости, за азота, являющейся установленным счет кватернизации методом ДЛЯ снижения токсичности [98]. Тем не менее, использованные в настоящей работе концентрации дендримеров находятся выше их нетоксичного уровня лальнейшие быть исследования должны сосредоточены на ИХ И поверхностной модификации, позволяющий снизить токсичность. Также стоит отметить, что уровень экспрессии прионного белка в клетках невысок, что позволяет предположить, что нетоксичных концентраций дендримеров будет достаточно для того, чтобы воздействовать на белковые агрегаты in vivo.

З ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 РЕАГЕНТЫ И РАСТВОРИТЕЛИ

Следующие соединения использовались без дополнительной очистки: 2.2'-пиридил (97%), 1,3-дифенилацетон, тетракис-(трифенилфосфин)палладия (0),4,4'-дибромстильбен (95%), 4,4'-дибромбензил (90%), тетрабутиламмония фениллитий, 2-пиридилацетонитрил, фторид (1M)5% раствор В тетрагидрофуране, содержащий воды), (триизопропилсилил)ацетилен (97%). трет-бутоксид (99.99%). калия диметилсульфоксид безводный (>99.9%), гидроксид калия (>85%), гидроксид дифениловый эфир (99%) (Sigma-Aldrich); натрия, тетрагидрофуран, ацетонитрил, бензол, гексан, сульфат натрия безводный (продукты фирмы Panreac); 1,3,5-триэтинилбензол (продукт фирмы Avocado), диметилсульфат (Sigma-Aldrich), соли, буферы, ИПТГ, тиофлавин Т и S, о-фенилендиамин (Sigma-Aldrich).

Плазмида, кодирующая синтез овечьего прионного белка PrP-V136R154Q171 (25-233) была предоставлена профессором H. Rezaei (Institute National de la Recherche Agronomique, Virologie et Immunologie Moleculaires, Jouy-en-Josas, France). Мышинные моноклональные анти- PrP антитела 66.100b3, специфические к последовательности K26RPKP30 N-концевого участка PrP были предоставлены J.P.M. Langeveld (Department of Bacteriology and TSEs, Central Institute for Animal Disease Control, Lelystad, Netherlands).

Очистка растворителей:

О-ксилол перегоняли с дефлегматором над металлическим натрием в инертной атмосфере при атмосферном давлении, предварительно прокипятив в течение 1 часа, Т_{кип} 144-145°C (лит. Т_{кип}144,4°C).

3.2 СИНТЕЗ ИСХОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Синтез 1,3-дипирид-2-ил-2-пропанона



Синтез основан на методике, опубликованной ранее [233]. 2-Пиколин (60 мл, 0.56 моль) постепенно добавляли к свежему раствору фениллития (53.4 г, 0.63 моль) в

диэтиловом эфире (500 мл). Реакционную смесь кипятили 30 мин. и по каплям прибавляли к ней 2-пиридилацетонитрил (25 г, 0.21 моль). По окончании прибавления реакционную смесь кипятили 1.5 ч, охлаждали до комнатной температуры и при интенсивном перемешивании (магнитная мешалка) помещали (на воздухе) в 2 л водной HCl (2N). Водный слой отделяли, кипятили в течение 1.5 ч и после нейтрализации NaOH экстрагировали CHCl₃. Органический слой сушили над MgSO₄, затем растворитель отгоняли на роторном испарителе. Образовавшееся масло перегоняли в вакууме с воздушным холодильником, собирая фракцию с Т_{кип} 153–170°С при ~ 0.5 мм рт. ст. Выход 45% (20.2 г). $T_{\text{кип}}$ 130–135 °С, $T_{\text{пл}}$ 80– 81°С. Спектроскопия ЯМР ¹Н (ДМСО-d₆, 300 МГц, δ, м.д.): 5.44 (с, СНенольная форма), 3.68 (с, CH₂-енольная фома), 4.07 (с, CH₂-кетонная форма), 8.48, 8.25, 7.34 (д. 4H_{пирилил}), 7.65-7.76, 7.29-7.21, 7.08-6.90 (3м, 12H_{пирилил}). Элементный анализ, рассчитанный для C₁₃H₁₂N₂O, %: C, 73.57; H, 5.70; N, 13.20; найденный: С, 73.55; Н, 5.73; N, 13.18.

Синтез 4,4'-Бис(триизопропилсилилэтинил)бензила



8.83. Найденный: С 75.60; Н 9.00.

4,4'-Бис(триизопропилсилилэтинил)бензилбыл синтезирован ИЗ коммерчески 4,4'доступного дибромбензила палладий-катализируемым кросссочетанием С триизопропилсилилацетиленом В соответствии с методикой [233]. Выход 86%. Спектроскопия ЯМР ¹Н (200 МГц, CD₂Cl₂) 7.98-7.93 (д. 4Н), 7.66-7.62 (д. 4Н), 1.19-1.07 (м. 42Н); MS, *m/z*: 570 (М⁺). Элементный анализ, рассчитанный для C₃₆H₅₀Si₂O₂, %: С 75.73; Н

Синтез 3,4-*бис*(4-(триизопропилсилилэтинил)фенил)-2,5-дипирид-2-илциклопента-2,4-диенона (1)



Синтез осуществляли по методике, описанной ранее [233]. Реакцию проводили в среде аргона. В трехгорлую колбу помещали 4,4'*бис*(триизопропилсилилэтинил)бензил (5.34 г, 9.36 ммоль), 1,3-дипирид-2-ил-2-пропанон (1.99 г, 9.36

ммоль), 1,3-дипирид-2-ил-2-пропанон (1.99 г, 9.36 ммоль) и 23 мл этанола. Реакционную массу нагревали до 60°С, затем медленно прикапывали к ней раствор КОН (0.03 г, 0.47 ммоль) в 1.5 мл этилового спирта.Синтез вели в течение трех часов. Выпавший осадок (енолон) ярко-оранжевого цвета отфильтровывали на фильтре Шота и промывали небольшим количеством холодного этилового спирта. Выход продукта 82%. Спектроскопия ЯМР ¹Н (CDCl₃, 300 МГц, δ , м.д.): 8.69 (д, 1H_{пиридил}), 8.54 (д, 1H_{пиридил}), 7.73 (т, 1H_{пиридил}), 7.63 (т, 1H_{пиридил}), 7.4-7.15 (м, H_{аромат.}), 4.15 (с, 1H, енолон), 1.09 (с, 42H_{алифат.}). Дальнейшая циклизация енолона в 3,4-*бис*(4-(триизопропилсилилэтинил)фенил)-2,5-дипирид-2-илциклопента-2,4-диенон протекает in situ в условиях реакции Дильса-Альдера.

Синтез 2,5-дифенил-3,4-дипирид-2-ил-циклопента-2,4-диенона (2)



2,5-Дифенил-3,4-дипирид-2-ил-циклопента-2,4-диенон был синтезирован по известной методике [233] конденсацией 2,2'-дипиридилэтандиона с 1,3-дифенилацетоном. Выход 78%. Т_{пл} 200–202°С. Спектроскопия ЯМР ¹Н (CDCl₃, 400

МГц): 8,35 (д, 2H_{пиридил}), 7.58-7.52 (т, 2H_{аромат.}), 7.30-7.20 (м, 12H_{аромат.}), 7.13-7.06 (т, 2H_{аромат.}). MS, *m/z*: 386 (M⁺). Элементный анализ, рассчитанный для C₂₇H₁₈N₂O, %: C, 83.92; H, 4.70; N, 7.25; Найденный, %: C, 83.76; H, 4.49; N, 7.28.

Синтез 2,3,4,5-тетрапирид-2-ил-циклопента-2,4-диенона (3)



Синтез осуществляли по методике, описанной ранее [233]. 1,2-Дипирид-2-ил-этан-1,2-дион (2 г, 9.42 ммоль) и 1,3дипирид-2-ил-пропан-2-он (1.99 г, 9.42 ммоль) растворяли в этаноле (14 мл) при 60°С в инертной атмосфере (Ar).

Затем к реакционной массе медленно прикапывали раствор КОН (0.03 г, 0.47 ммоль) в 1.5 мл этилового спирта. Синтез вели в течение трех часов, после чего отгоняли растворитель и осаждали реакционную массу в гексан. Образовавшийся енолон белого цвета нагревали до 200°С в этиленгликоле (10 мл на 0.1 моль продукта), конечный продукт представляет собой осадок ярко-оранжевого цвета. Выпавший осадок отфильтровывали на фильтре Шотта и промывали небольшим количеством холодного этилового спирта. Выход продукта составил 74% (2.71г). $T_{n\pi}$ =81-83°С. Спектроскопия ЯМР ¹Н (300 МГц, CDCl₃): 8.69, 8.66 (2д, 2Н, пиридил), 8.50, 8.43 (2д, 2Н, пиридил), 7.85 – 7.69 (м, 4Н, пиридил), 7.66 – 6.93 (м, 8Н, пиридил), 7.33-7.15 (m, аромат.). МS, *m/z*: 388 (М⁺). Элементный анализ, рассчитанный для $C_{25}H_{16}N_4O$, %: С 77.31; Н 4.15; N 14.42; найденный: С 77.51; Н 4.23; N 14.06.

3.3 СИНТЕЗ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ Общая методика реакции циклоприсоединения по Дильсу-Альдеру

Реакцию проводили в колбе Шленка при перемешивании на магнитной мешалке в инертной атмосфере (Ar). В колбу помещали циклопентадиенон (1,5-2 моль на 1 этинильную группу), соответствующее арилэтинил производное и о-ксилол (или дифениловый эфир для высоких генераций) (4,5·10⁻³ моль/л). Реакционную массу нагревали до 150°C (175°C в случае дифенилового эфира). Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии, а время проведения реакции зависело от

номера генерации и варьировалось в пределах от 4 ч. для G_1 , 12 ч. для G_2 и до 24 ч. для G_3 . После охлаждения реакционную массу упаривали, добавляли CH_2Cl_2 и осаждали дендримеры с терминальными триизопропилсилильными группами в ацетонитрил, а с пиридильной периферией – в гексан. После повторного осаждения осадок высушивали в вакуумном шкафу при 100°С.

Общая методика реакции десилилирования триизопропилсилилзамещенных дендронов

Реакцию проводили при перемешивании на магнитной мешалке в среде аргона при комнатной температуре. К раствору триизопропилсилилзамещенного дендримера (2.3×10^{-4} M) в смеси ТГФ и бензола (соотношение 3/1) медленно прикапывали 1М раствор фторида тетрабутиламмония (3 моль Bu₄NF на каждую триизопропилсилильную группу) в ТГФ. Через 8 ч. растворитель отгоняли, добавляли CH₂Cl₂ и промывали водой. Органическую фазу отделяли и сушили над MgSO₄. После отгона растворителя на роторном испарителе, продукт осаждалив гексан, отфильтровывали, промывали гексаном и сушили.

Синтез дендримера первого поколения G₁-ТиПСА (4)



м. м. =2307,73 мол. формула =C₁₅₆H₁₈₀N₆Si₆ Синтез дендримера проводили в соответствии с общей методикой получения дендримеров по реакции Дильса-Альдера [233]. В качестве исходных реагентов использовали **1,3,5-триэтинилбензол** и **3,4***бис*(**4** - (**триизопропилсилилэтинил**)**фенил**)-**2,5-дипирид-2-ил-циклопента-2,4-диенон** (**1**). Синтез вели в течение 6 ч. Выход: 83%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.65 (д,3H_{пиридил}), 8.05 (д, 3H_{пиридил}), 7.78 (с, 3H_{аромат.}), 7.30 -6.70 (м, 45H_{аромат.}), 1.09(с, 126H_{алифат.}).MALDI-ToF м/з: 2308 (М⁺, рассч. 2307,73). Элементный анализ рассчитанный для C₁₅₆H₁₈₀N₆Si₆, %: С 81.19; Н 7.86; N 3.64; Si 7.30; найденный, %: С 79.73; Н 7.69; N 3.47, Si 7.16.

Синтез дендримера первого поколения G₁-этин (5)



М.М. =1369,66 мол. формула =С₁₀₂Н₆₀N₆ Раствор **G**₁-**ТиПСА** (5) Синтез вели по известной методике [233]. Выход продукта составил 90 %. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.64 (д, 3H_{пиридил}), 8.02 (д, 3H_{пиридил}), 7.81 (с, 3H_{аромат.}), 7.45 -6.55 (м, 45H_{аромат.}), 3.01, 2.97 (2с, 6H_{ацетилен.}). MALDI-ToF, м/з: 1370 (М⁺, рассч. 1369,66). Элементный анализ рассчитанный для C₁₀₂H₆₀N₆, %: C 89.45; H 4.42; N 6.14; найденный, %: C 87.95; H 4.35; N

6.05.

Синтез дендримера второго поколения G2-ТиПСА (6)



Синтез дендримера проводили в соответствии с общей методикой получения дендримеров по реакции Дильса-Альдера [233]. В качестве исходных реагентов использовали G₁-этин (5) и 3,4-бис(4-(триизопропилсилилэтинил)фен-1-ил)-2,5дипирид-2-ил-циклопентан-2,4-диенон (1). Время проведения синтеза 24ч. Выход: 67%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.62 (д, 9Н_{пиридил}), 8.30 (д, 9Н_{пиридил}), 7.78, 7.74 (2с, 9Н_{аромат.}),7.48 -6.51 (м, 129H_{аромат.}), 1.09(с, 252H_{алифат.}). MALDI-ToF м/3: 5685 ([M]⁺, рассчит.5684.75). Элементный анализ рассчитанный для C₃₉₀H₄₀₈N₁₈Si₁₂, %: С 82.40; H 7.23; N 4.44, Si 5,93; найденный, %: С 81.76; H 7.11; N 4.27; Si 5.66.

Синтез дендримера второго поколения G₂



Синтез дендримера проводили В соответствии с общей методикой получения дендримеров по реакции Дильса-Альдера [233]. B качестве исходных реагентов использовали G₁-этин (5) и 2,5-дифенил-3,4дипирид-2-ил-циклопента-2,4-диенон (2). Время проведения синтеза 15 ч. Выход: 85%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 8.59 (д, 3Н_{пирилил}), 8.24-8.10 15H_{пирилил}), 7.74-7.65 (д, (м, 7.43-6.64(м, 141H_{аромат}).MALDI- $9H_{apomat}$),

ТоF м/з: 3520 (М⁺, рассчит. 3520,34). Элементный анализ рассчитанный для C₂₅₈H₁₆₈N₁₈, %: C 88.03; H 4.81; N 7.16; найденный, %: C 87.16; H 4.73; N 6.97.

Синтез дендримера второго поколения G2-этин (7)



мол. формула=С₂₈₂H₁₆₈N₁₈

Синтез вели по известной методике [233]. Выход продукта составил 89%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.62 (д, 9Н_{пиридил}), 8.28 (д, 9Н_{пиридил}), 7.78, 7.77(2с, 9Н_{аромат.}), 7.47 -6.52 (м, 129Н_{аромат.}), 3.05, 3.02 (2с, 12Н_{ацетилен.}). МАLDI-ТоF м/з: 3808 (М⁺, рассчит. 3808,60). Элементный анализ рассчитанный для С₂₈₂Н₁₆₈N₁₈, %: С 88.93; Н 4.45; N 6.62; найденный, %: С 87.06; Н 4.26; N 6.43.



Синтез вели по методике [233]. В исходных качестве реагентов использовалии G2-этин (7) и 2,3,4,5-

тетрапирид-2-ил-циклопента-2,4диенон (3). Время проведения синтеза 40 ч. Выход: 74%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.54 (д. 21Н_{пирилил}), 8.23-8.10 (д. 45H_{пирилил}), 7.79, 7.73, 7.63 (3с, 21H_{аромат}) 7.45 - 6.52 (м, 273H_{аромат.}).МАLDI-ТоF $(M^+, рассчит.$ м/з: 8133 8133,67). Элементный анализ рассчитанный для C₅₇₀H₃₆₀N₆₆, %: C 84.17; H 4.46; N 11.37; найденный, %: С 82.93; Н 4.24; N 11.16.

Синтез дендримера третьего поколения G₃-ТиПСА (8)



Синтез вели по методике [233]. В качестве исходных реагентов использовали G2-этин (7) и 3,4-бис-(4-

(триизопропилсилилэтинил)фен-1ил)-2,5-дипирид-2-ил-циклопента-2,4-диенон (1). Время проведения синтеза 32 ч. Выход: 65%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.55-7,95 (м, 21Нпиридил), 8.24-8,14 (м, 21Нпиридил), 7.67, 7.62, 7.55 (3с,

М.м.=12452.83 мол.формула=С₈₅₈Н₈₆₄N₄₂Si₂₄

21Наромат.), 7.49 -6.10 (м, 299Наромат.), 1.09(с, 504Налифат.). MALDI-ToF

м/з: 12453 (М+, рас-счит.12452,83). Элементный анализ рассчитанный для C858H864Si24, %: C 82.85; H 7.01; N 4.72; Si 5.41 найденный, %: C 81.13; H 6.83; N 4.59, Si 5.18.

Синтез дендримера третьего поколения G₃-этин (9)



Синтез вели по известной методике [233]. Выход продукта составил 88%. ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) 8.6-7.95 (м, 21H_{пиридил}), 8.25-8.05 (м, 21H_{пиридил}), 7.70, 7.64, 7.57 (3с, 21H_{аромат.}), 7.42 -6.25 (м, 299H_{аромат.}), 2.99- 2.95 (м, 24H_{ацетилен.}).МАLDI-ТоF м/3: 8700 (М⁺, рассчит. 8700,53). Элементный анализ рассчитанный для C₆₄₂H₃₈₄N₄₂, %: С 88.77; Н 4.47; N 6.76; найденный, %: С 86.54; Н 3.99; N 6.21.

Синтез дендримера четвертого поколения G₄

Синтез дендримера проводили в соответствии с методикой [233]. В качестве исходных реагентов использовали G₃-этин (9) и 2,3,4,5-тетрапирид-2-ил-



циклопента-2,4-диенон (3). Время проведения синтеза 96 ч. Выход: 75%. ¹Н МГц, CDCl₃) 8.65-8.45 (м, ЯМР (400 45H_{пиридил}), 8.4-8.08 (м, 93H_{пиридил}), 7.78-7.50 $(M, 45H_{apomat}), 7.45 - 6.50 (M, 585H_{apomat}).$ MALDI-ToF 17337 (M⁺, м/з: рассчит. 17336,63). Элементный анализ рассчитанный для С₁₂₁₈Н₇₆₈N₁₃₈, %: С 84.39; Н 4.47; N 11.15; найденный, %: C83.02; H 3.96; N 10.85.

М.м.=17336.63 мол.формула=С₁₂₁₈Н₇₆₈N₁₃₈

3.4 СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Общая методика реакции алкилирования пиридилфениленовых дендримеров

Исходный гидрофобный пиридилфениленовый дендример в количестве 100 мг растворяли в 4.9 мл этилового спирта. Затем по каплям добавляли 92 мкл диметилсульфата из расчета 20 % молярного избытка (CH₃)₂SO₄ на каждую пиридильную группу. Синтез вели при комнатной температуре в течение 6 часов. Продукт выделяли осаждением в диэтиловый эфир.

Синтез катионного дендримера второй генерации G2



Синтез проводили В соответствии c методикой [247]. Элементный анализ рассчитанный для $C_{258}H_{168}N_{18}+18$ (CH₃)₂SO₄, %: S 9,95; найденный, %: S 7,74. Степень алкилирования $\beta_{1HMMP} = 82\%$, β_{эл.ан.(S)}=85%

Синтез катионного дендримера третьей генерации G3



Синтез проводили в соответствии с методикой [247]. Элементный анализ рассчитанный для $C_{1266}H_{816}N_{90}$ +90(CH₃)₂SO₄, %: S 10,05; найденный, %: S 9,80. Степень алкилирования $\beta_{^1HЯMP}$ =73%, $\beta_{_{3Л.ан.}(S)}$ =75%.

Синтез катионного дендримера четвертой генерации G4

$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Синтезпроводиливсоответствиисметодикой[247].ЭлементныйанализрассчитанныйдляС ₁₂₁₈ H768N138+138(CH3)2SO4, %:S12,71;найденный, %:S
\ H ₃ C N→ H ₃ C N→ H ₃ C N→ H ₃ C N→ N→ CH ₃ (→→) → (→) → (→) → (→→) → (→→) → (→→) → (→→) → (→→) → (→→) → (→→	S 12,71; найденный, %: S
	10,49. Степень алкилирования
$\begin{array}{c c} & & & & & \\ & & & & \\ & & & \\ H_{1}C = H_{1} & & \\ & & & \\ H_{2}C = H_{2} & & \\ & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & &$	β _{'HЯМР} =82%, β _{эл.ан.(S)} =83%
H ₃ Ć H ₃ Ć ČH ₃	

3.5 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОВЕЧЬЕГО ПРИОННОГО БЕЛКА

Экспрессию полноцепочечного рекомбинантного овечьего прионного белка VRO проводили культуре *E*. Coli BL21(DE3), В клеток трансформированных плазмидой pET-22b(+). Экспрессию белка индуцировали добавлением раствора ИПТГ в концентрации 1 моль/л. Клетки культивировали в течение ночи, после чего отделяли от культуральной среды центрифугированием при 6000 об/мин в течение 25 минут, а осадок тщательно промывали 50 мМ Трис-HCl буфером, pH=7. Бактериальные осадки суспендировали в лизирующем буфере, содержащем 0,5 мг/мл лизоцима, 10 мМ ЭДТА, 0.1 % TritonX100, pH = 8,0 и 100 µл коктейля ингибиторов протеаз, инкубировали 30 мин при 37 °C и перемешивании. разрушали Затем клетки воздействием ультразвука (FisherBioblock, Франция). После чего пробы центрифугировали в течение 12 минут при 10000 об/мин с получением нерастворимых телец включения, содержащих прионный белок. В случае, если дальнейшая работа проводилась с тельцами включения, проводили дополнительную очистку, согласно методике [248].

Для выделения чистого прионного белка, тельца включения растворяли в буфере, содержащем 6 М гуанидин гидрохлорид (50 мМ Трис -HCl,0.5 M NaCl), после чего проводили очистку с помощью аффинной хроматографии с использованием Ni-хелатированной сефарозы.

Хроматографическое разделение оказывается возможным благодаря наличию в структуре приона гистидинового участка, обладающего высоким сродством к двухвалентным металлам. Для разделения использовали носитель Chelating Sepharose EF, который насыщали ионами никеля промыванием раствором NiSO₄ 6H₂O (0,2 M). Затем колонку промывали 20 мМ ацетатным буфером, pH = 4,0 для удаления непрочно связавшихся ионов и уравновешивали буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl, 0.5 M NaCl, 10

мМ имидазол, 8М мочевину, pH =7,4. На колонку наносили раствор белка, после чего проводили этап рефолдинга промыванием колонки буфером (20 мМ Трис-HCl, 0,3 M NaCl, 20 мМ имидазол,pH =7,4). Белок элюировали 1М имидазольным буфером pH = 7,4. Концентрацию белка в пробах определяли спектрофотометрически, а чистоту подтверждали электрофорезом по Лэммли. Пробы диализовали против 10 мМ CH₃COONH₄ буфера, pH=5,0, лиофильно высушивали и хранили при -20 °C.

3.6 ФОРМИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕЖДУ ДЕНДРИМЕРАМИ И НАТИВНЫМ ОВЕЧЬИМ ПРИОННЫМ БЕЛКОМ

Требуемое количество порошка дендримера растворяли в рабочем буфере до получения насыщенного раствора (5, 2,5 и 1,25 мМ для G2, G3 и G4, соответственно). Полученные растворы использовали в экспериментах в качестве стоковых.

Навеску сухого белка растворяли в 100 мМ натрий-ацетатном буфере, pH=4,0, затем переводили в требуемый буфер (калий-фосфатный, MOPS в зависимости от проводимого далее эксперимента) путем пропускания раствора белка через обессоливающую колонку, заполненную Сефадексом G25. Белок, растворенный в натрий-ацетатном буфере, наносили на колонку, элюировали требуемым буфером и собирали фракции по 0,1 мл. Наличие белка в отобранных фракциях проверяли окрашиванием амидом черным на нитроцеллюлозной мембране, после чего пробы с белком объединяли и определяли концентрацию белка.

Для получения комплексов требуемые количества растворов дендримера и приона смешивали до получения заданной концентрации. В случае необходимости добавляли дополнительное количество буфера. Пробы оставляли для уравновешивания на 30 мин перед измерениями.

3.7 ИНГИБИРОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ПРИОННОГО БЕЛКА

Стоковый раствор белка в 100 мМ натрий-ацетатном буфере pH=4.0 разбавляли до достижения заданной концентрации - 2 мг/мл (87 µМ). Затем добавляли раствор дендримера до достижения финальной концентрации 100 или 250 µМ и азид натрия (финальная концентрация 0,03 мас.%). Процесс фибриллизации индуцировали добавлением гуанидин гидрохлорида до 1М концентрации, после чего пробы инкубировали при 37 °C и постоянном перемешивании в течении 70 часов. Контрольные пробы были приготовлены аналогичным образом, но без добавления дендримера.

Для получения небольших растворимых олигомеров навеску сухого белка растворяли в 100 мМ натрий-ацетатном буфере pH=4,0 и переводили в 20 мМ MOPS буфер pH=7,5 через обессоливающую колонку, заполненную сефадексом G25. Полученный стоковый раствор разбавляли до достижения концентрации белка 1 мг/мл (40 µМ). К раствору белка добавляли растворы дендримеров до конечной концентрации 100 или 200 µМ, азид натрия и при необходимости дополнительное количество буфера. Пробы термостатировали при 65 °C в течение 2,5 ч.

3.8 РАЗРУШЕНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ

Исходное количество белка - 16 мг - суспендировали в 1 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера pH=7.5 и обрабатывали УЗ (2*7с, 10% амплитуда). В каждую пробу вносили 25 µл суспензии телец включения, 5 µл 3 % раствора NaN₃ и 10, 20, 30 µл для G2, G3 и G4 стоковых растворов дендримеров для достижения концентрации в пробе 0.1 мМ, либо 100, 200, 300 µл для достижения концентрации 1 мМ, а также дополнительное количество буфера до достижения концентрации белка 35 µМ. Пробы
инкубировали в течение 21 часа при температуре 37 °С и перемешивании, затем центрифугировали (15 мин, 6000 об/мин) и анализировали супернатант. Условия центрифугирования подобраны таким образом, что происходит осаждение только больших частиц (таких как оставшиеся нерастворенными тельца включения), в то время как небольшие частицы остаются в растворе.

3.9 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Спектры ЯМР ¹Н и ¹³С измеряли на спектрометре Bruker AMX 400. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (м.д.) относительно сигнала растворителя.

MALDI ToF масс-спектрометрия

Масс-спектрометрический анализ проводился на масс-спектрометрах ZAB2-SE-FPD (VG Analytical) и Bruker Reflex-TOF. MALDI-TOF массспектры измерялись с помощью лазера с длиной волны 337 нм. В качестве матриц использовался Dithranol (1,8,9-тригидроксиантрацен) и TCNQ (тетрацианохинодиметан).

Элементный анализ

Состав синтезированных мономеров, дендримеров определяли в лаборатории микроанализа ИНЭОС РАН. Определение содержания азота осуществляли сжиганием образца (5-10×10-3г) в атмосфере диоксида углерода, предварительно смешав его со смесью окислителя (NiO) и плавня

(PbO), при температуре T = 900°C. Содержание углерода и водорода определяли путем сжигания навески образца (5-10×10-3г) в атмосфере газообразного кислорода при температуре T = 950°C.

Динамическое лазерное светорассеяние

Эксперименты по динамическому светорассеянию выполняли на установке «ZetaSizer NanoZS» (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Все измерения проводили при угле рассеяния 173°, температуре 25°С, в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.5, с использованием бидистиллированной воды. Время единичного измерения равнялось 15 с, а данные суммировались как минимум из 8 измерений.

Флуоресценция тиофлавина Т

Изменения в содержании бета-складчатой структуры белка при ингибировании фибриллизации, а также разрушении амилоидных агрегатов приона отслеживались с помощью измерения флуоресценции тиофлавина Т. Свежеприготовленный раствор тиофлавина добавляли в пробу в 20-кратном молярном избытке по отношению к белку. Флуоресценцию измеряли в приборе Fluorolog Hitachi F 4500 в диапазоне волн 450-550 нм при комнатной температуре и длине волны возбуждения 435 нм.

Гель электрофорез по Лэммли.

Для проведения электрофореза в невосстанавливающих условиях по методу Лэммли к пробам добавляли равное по объему количество буфера для образцов, содержащего 0,125 М Трис-HCl, pH 6,8; 4% ДСH; 20% глицерин (по объему); 0,02% бромфеноловый синий. Пробы инкубировали при 99 °C в

течение 5 мин, после чего проводили разделение в 12.5 % полиакриламидном геле при постоянной силе тока 10 и 20 мА для концентрирующего и разделяющего гелей, соответственно. В каждую лунку вносили объем пробы из расчета 2 мкг белка. В случае проб, содержащих контрольные растворы дендримеров без белка, в лунку вносили 10мкл 0.1 мМ растовра. После разделения пробы окрашивали раствором, содержащим 0,04% Кумасси R-250, 20% изопропанола, 10% этанола и 10% уксусной кислоты, при нагревании. Затем гели тщательно промывали раствором 10%-ной уксусной кислоты.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд, либо спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции приона A₂₈₀= 2,6. Для определения концентрации белка по методу Брэфорд, использовали калибровочные кривые, полученные для растворов приона с известной концентрацией.

Спектроскопия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма регистрировали на приборе Jasco J-815 CD в диапазоне 207-260 нм при 25 °C в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм.

Для исследования влияния дендримеров на нативный прион готовили ряд растворов с соотношением белка к дендримеру, равным 1:1, 1:2 и 1:5. Для этого к раствору приона в концентрации 20 µM в 20 мM MOPS буфере, pH=7,5 добавляли растворы дендримеров в аналогичном буфере до достижения требуемого соотношения. Для оценки влияния дендримеров на олигомеризацию приона, 100 µл каждой пробы, полученной при нагревании приона при 65 °C, согласно условиям олигомеризации, в присутствии или отсутствии (контроль) дендримеров помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 0,1 мм. Для проб, содержащих дендримеры в концентрации 200 µM, предварительно добавляли 50 µл 20 мМ MOPS буфера, pH=7.5. Контрольные растворы пиридилфениленовых дендримеров использовали в качестве базовой линии.

Изотермическая титрационная калориметрия

Эксперименты по изотермической титрационной калориметрии выполнялись на калориметре VP-ITC при температуре 25°C. Раствор приона в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH = 7.5 в концентрации 10 µМ титровали10 µл раствора дендримера в концентрации 100 µМ в таком же буфере с интервалом между введениями новой порции титранта 5 мин. Из полученной изотермы связывания вычитали изотерму разбавления дендримера в буфере, полученную путем титрования буфера раствором дендримера. Данные анализировали в программе MicroCal Origin 7.0 с использованием модели "one set of sites". Перед измерениями все пробы дегазировали.

Метод тушения собственной флуоресценции белка

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Jobin Yvon) при 25 °C. Для этого раствор приона в 10 мМ MOPS буфере pH=7.5 с концентрацией 5 µМ титровали раствором дендримера. При этом концентрация дендримера возрастала от 0,5 до 2 µМ. Титрование проводили непосредственно во флуориметрической кварцевой

кювете с длиной оптического пути 1 см. После добавления новой порции титранта, пробы перемешивали и снимали спектр эмиссии триптофана с использованием длины волны возбуждения 295 нм.

Исследование стабильности комплексов прионного белка с дендримерами

Для анализа стабильности комплекса прионного белка с дендримерами под действием противоположно заряженного полимера, раствор, содержащий 10 µМ PrP и 25 µM дендримера в 10 мМ MOPS буфере, pH=7.5, титровали 10 µл раствора декстран сульфата в таком же буфере с концентрацией 1 мМ. При этом концентрация декстран сульфата возрастала от 12.5 до 175 мкмоль/л. После добавления декстран сульфата пробу перемешивали и через 20 минут измеряли размер частиц на приборе «ZetaSizer NanoZS» (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Измерения гидродинамического диаметра производили согласно методике, описанной выше.

Для изучения стабильности комплекса под действием соли, в пробу, содержащую комплекс дендримера с прионом в эквимолярном соотношении (5 µM) в 10 мМ MOPS буфере, pH=7.5 последовательно вносили 5 µл 2 М раствора NaCl до достижения итоговой концентрации 2.5 М. Раствор перемешивали и производили измерение флуоресценции с длиной волны возбуждения 295 нм и эмиссии 352 нм. Новые порции титранта вводили каждые 3 мин, а титрование проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (JobinYvon) при 25 °C.

Иммуноблоттинг

На первом этапе проводили разделение проб в 12.5% полакриламидном геле по методу Лэммли, после чего гели тщательно промывали водой для удаления остатков СДС. Затем осуществляли перенос разделенных соединений на нитроцеллюлозную мембрану при постоянном напряжении 100 В. Перенос соединений на мембрану контролировали с помощью окрашивания красителем 0.2% раствором PonceauS в 3% уксусной кислоте. Примечательно, что процесс переноса комплекса белка с дендримером занял 5 часов. стандартных 40 МИНУТ. Мембрану вместо промывали дистилированной водой с добавлением Трис для удаления красителя и блокировали возможные места неспецифического связывания инкубированием мембраны в 10% растворе обезжиренного молока в буфере PBST(10 мМ КН₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% Tween-20) в течение 10 минут при постоянном перемешивании. После блокировки мембрану помещали в раствор первичных мышиных антител против N-концевого фрагмента прионного белка в 5 % обезжиренном молоке и инкубировали в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Мембрану тщательно промывали буфером PBST и помещали в раствор вторичных антител (антитела против мышиных антител, конъюгированные с пероксидазой). Инкубирование проводили в течение 1 часа, после чего мембрану тщательно промывали и проводили окрашивание с помощью раствора хромогенного субстрата, содержащего 3 мг диаминобензидина, 30 мг NiSO₄×7H₂O, 10 μ л 30% H₂O₂в 10 мл 0.1MTris-HCl, pH=7.6. В случае точечного блота, 10 µл пробы помещали непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану и икубировали ее с анти-PrP антителами по описанной выше методике.

Иммуноферментный анализ

100 µл раствора антигена (супернатант, полученный после инкубации телец включения с дендримерами) и 100 µл пробы, служащей контролем (антитела, раствор дендримера, прион, а также супернатант телец включения без инкубации с дендримером), помещали в 96-луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре и медленном перемешивании в течение 1 часа. После иммобилизации антигена ячейки несколько раз промывали буфером PBST(10 мМ КН₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% Tween-20) и добавляли 100 µл раствора моноклональных антител против прионного белка. Планшет инкубировали аналогичным образом в течение 1 часа, промывали буфером PBST. После формирования комплекса антиген антитело, добавляли 100 µл раствора вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Через час планшет заново промывали. На последнем этапе проводили ферментативную реакцию. Для этого в каждую лунку добавляли 100 µл раствора, содержащего 10 мл цитратного буфера, 20 µл 30 % H₂O₂ и 200 µл о-фенилендиамина, инкубировали в течение 10 минут, после чего добавляли 50 µл 0.1 H H₂SO₄ и регистрировали оптическую плотность в приборе StatFax 2100 MicroplateReader (AwarenessTechnologies, UK) при длине волны 490 нм. Полученное таким образом значение оптической плотности комплекса белка с дендримером пропорционально концентрации которая может быть оценена с использованием полученной белка, аналогичным образом калибровочной кривой по чистому прионному белку с известной концентрацией. Для этой цели использовали растворы белка PrP ARR в натрий ацетатном буфере в концентрациях 0.05÷1 г/мл. При этом из значения оптической плотности комплекса белка с дендримером вычитали значения оптической плотности всех использованных контрольных проб (в том числе и дендримера), после чего оценивали количество белка, высвободившегося в раствор, с использованием калибровочной кривой.

151

Агрегация в присутствии затравок фибрилл

Для изучения способности комплексов приона с дендримерами, образующихся в процессе ингибирования формирования амилоидных фибрилл, вызывать амилоидную трансформацию нативного белка. проводили агрегацию с использованием затравок. Для этого полученные комплексы были отделены от несвязавшегося дендримера с помощью центрифугирования в эппендорфах, снабженных фильтром на 50 кДа, а оставшийся осадок тщательно промывали 20 мМ MOPS буфером, pH=7.5 и центрифугировали. Полученные образом заново таким комплексы использовали в качестве затравки. Затем к 40 µM раствору нативного приона в 20 мМ MOPS буфере, pH=7.5 добавляли затравку до концентрации 0.8 мкМ и инкубировали при 37 °C и постоянном перемешивании. В контрольных экспериментах в качестве затравки использовали фибриллы, полученные в Ход процесса отсутствие дендримеров. контролировали измерением флуоресценции тиофлавина Т. Для этого перед каждым измерением 50 µл пробы смешивали с 50 µл 800 µМ раствора тиофлавина Т. Флуоресценцию снимали на планшетном флуориметре PerkinElmer Multilabel Reader Victor Х5. Измерения проводили каждые 12 ч в течение 100 ч.

Протеолиз

Для того чтобы оценить чувствительность проб, полученных в ходе ингибирования дендримерами фибриллизации приона, к действию протеазы К, пробы после фибриллизации переводили в 20 мМ МОРЅ буфер, pH=7.5 с помощью диализа. Затем в пробу с концентрацией белка 40 µМ вносили раствор CaCl₂ до концентрации 5 µМ. Раствор тщательно перемешивали, после чего вносили раствор протеазы К до концентрации 0.1 µг/мл. Смесь инкубировали в течение 5 и 10 минут при 37 °C. Протеолиз останавливали

добавлением буфера для форезных образцов и прогреванием проб в течение 5 мин при 95 °C. Анализ проводили с помощью электрофореза по Лэммли. Контрольные пробы отбирали до внесения раствора протеазы.

Флуоресцентная микроскопия

Фотографии флуоресцентной микроскопии были получены с помощью микроскопа Axiovert 200M, Carl Zeiss, с набором фильтров 38 (Carl Zeiss) и камерой ORCA II-ERG-2 (Hamamatsu). Для этого к суспензии оставшихся нерастворенными после обработки дендримерами телец включения добавляли раствор тиофлавина S до достижения 20 кратного молярного избытка относительно белка. Пробы наносили на предметные стекла, фиксировали и микроскопировали.

МТТ тест

Клеточные линии SH-SY5Y и MellL инкубировали в 96-луночном планшете (3000 клеток в 0.1 мл среды DMEM с добавлением 2% FBS), а затем обрабатывали дендримерами в концентрации 0.1, 1, 10 и 70 µМ. Цитотоксичность измеряли, используя стандартную методику проведения МТТ теста после 24 ч воздействия дендримеров. Каждую концентрацию тестировали 4 раза. Результаты анализировали с использованием спектрофотометра Universal Microplate Reader (Bio-Rad) при длине волны 570 нм.

Метод молекулярной динамики

Моделирование методом молекулярной динамики было проведено с использованием программного обеспечения GROMACS 5.1 и силового поля

GROMOS 54a7. Структура приона PDB ID 1tqb (chain A) была извлечена из PDB. Топологию базы данных дендримеров воспроизводили С использованием сервера PRODRG. Проводили набор симуляций системы, содержащей одну молекулу приона и пять молекул дендримеров. В свою очередь, для каждого дендримера проводили пять независимых симуляций с Расстояние различными исходными позициями дендримеров. между молекулами белка и дендримера равнялось 1-3 нм. Во всех случаях, в систему добавляли низкомолекулярные ионы (Cl⁻) для компенсации заряда дендримера, а также проводили короткие симуляции для уравновешивания. Длина основных симуляций составляла 250 нс с шагом в 2 фс. Длительность моделирования была подобрана на основании графиков RMSD, а также солевых мостиков между молекулами дендримера и приона, которые достигали плато. Использовали периодические граничные условия и метод частица-сетка Эвальда для расчета электростатических взаимодействий дальнего действия. Симуляции выполняли с использованием изотермоизобарического ансамбля (NPT). Поддерживали постоянную температуру 300 К с использованием алгоритма масштабирования скоростей частиц и постоянное давление с использованием алгоритма Берендсена.

Для анализа взаимодействия дендримеров с прионом было рассчитано число связей. Солевые мостики определялись как пара отрицательно заряженных групп PrP и положительно заряженных групп дендримера на расстоянии менее 0.35 нм. Число неполярных контактов определяли как число фениленовых групп дендримера на расстоянии менее 0.35 нм от белка. Влияние вторичную PrP связывания дендримеров на структуру анализировали на основании зависимости от времени RMSD белка без учета протонов. Кроме того, для определения структурных изменений, вызванных взаимодействием с дендримерами, рассчитывали распределение RMSD, а также последовательность PrP в последние 10 нс моделирования и сравнивали со структурой в момент начала моделирования.

154

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования высокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. Ломоносова [249].

Фракционирование в ассиметричном потоке поля (Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4))

Методы фракционирования наночастиц в потоке поля, впервые предложенные профессором Кельвином Гиддингсом в 1966 г., относятся к хроматографическим способам разделения. В этом случае высокая степень разделения смеси достигается при движении пробы в тонком потоке, перпендикулярно которому накладывается силовое поле (термическое, гравитационное/центробежное). Разделение происходит внутри канала, состоящего из двух пластин, разделенных спэйсером. Толщина спейсера обычно составляет 250 – 800 µм (Рисунок 53).

Разделение в ассиметричном потоке поля (AF4) – одна из техник фракционирования в потоке поля, при которой верхняя пластина, составляющая канал, является непроницаемой, а нижняя сделана из пористого материала и имеет отверстия. При этом нижняя пластина покрывается пористой мембраной с подходящим размером пор, не позволяющим разделяемым частицам покидать установку до окончания канала.

Внутри канала образуется параболический профиль потока за счет ламинарного течения жидкости, так какскорость потока жидкости у границы меньше, чем в центре канала. При наложении перпендикулярного потока, аналит движется по направлению к, так называемому, «участку накопления» канала.

Связанная с Броуновским движением диффузия создает проиводействующую частицам силу. Частицы с меньшим размером обладают

155

большей скоростью диффузии и достигают равновесия выше по каналу, где скорость продольного потока больше. Таким образом, происходит разделение частиц по размерам, основанное на различных скоростях диффузии, благодаря наличию градиента скорости внутри канала.



Рисунок 53 – Схематическое изображение рабочего канала установки по разделению наночастиц в ассиметричном потоке поля

Частицы меньшего размера элюируются первыми, и профиль элюции противоположен гель-проникающей хроматографии, где в начале происходит элюция больших частиц.

Примечательно, что при разделении в ассиметричном потоке поля в системе отсутствует твердая фаза, что позволяет предотвратить нежелательное взаимодействие с анализируемой пробой. Это особенно актуально для разделения высокозаряженных соединений, таких как катионные пиридилфениленовые дендримеры, так как высокая степень сорбции на стационарной фазе ограничивала возможности их анализа традиционными хроматографическими методами. Использование же установки AF4 позволяет достичь мягкого, быстрого и недеструктивного разделения.

Процедура фракционирования состоит из трех этапов. Во время первых двух этапов – введение и фокусировка – основной поток расслаивается и поступает в канал с обоих концов. Оба потока уравновешиваются и встречаются в точке введения пробы. После этой точки поток устремляется вниз и проникает через мембрану. После введения пробы, производится ее фокусировка в тонкую полосу и концентрирование по направлению к мембране. После введения всего объема пробы, поток останавливают для полной фокусировки в течении нескольких минут. Затем поток подается только из точки ввода, а выходит из клапана выхода, присоединенного к детектору.

Для измерений AF4 раствор дендримера с концентрацией 2 мг/мл фильтровали с использованием фильтров 450 нм перед введением в установку.

Эксперименты AF4 были произведены с использованием установки WyattEclipseDualTec (WyattTechnology, California), оснащенной каналом SC, насосом Agilent 1100 (включая модули дегазирования и автоподачи), а также УФ-детектором SPD-20Aи детектором по многоуловому рассеянию света Dawn 8+. Разделяющий канал состоял из спейсера W350 с длиной 15,5 см и шириной от 2,1 до 0,1 см и регенерированной целлюлозы с размером пор 5 кДа в качестве мембраны. Измерения на детекторах производились с интервалом в 1 с. Сбор и анализ данных производили с использованием программы ASTRA версия 6.1.1.17.

Процедура фракционирования состояла из этапов фокусировки, фокусировки с введением пробы, элюции и элюции с открытым клапаном ввода со скоростью потока, изображенной на рисунке 56. 0 – 50 µл пробы вводили в систему при скорости потока 0,2 мл/мин в течение 2 мин. На этапе элюции пробы элюировали со скоростью внешнего поля, уменьшающейся от 1,5 до 0,5 мл/мин в течение 10 мин, затем скорость линейно снижалась от 0,5 до 0 мл/мин. Процесс элюции проводили в течение дополнительных 10 минут с открытым клапаном ввода без наложения внешнего поля для удаления остатков. УФ-сигнал на фрактограммах автоматически нормализовывался относительно максимального измеренного значения оптической плотности.



Рисунок 54 – Изменение скорости потока в процессе разделения на установке AF4

Эксперименты по разделению дендримеров в ассиметричном потоке поля проводились на Фармацевтическом факультете Университета Монреаля, Канада, совместно с Dewang Ma, а также профессором Françoise M. Winnik.

выводы

 Синтезированы катионные пиридилфениленовые дендримеры и показано, что они формируют стабильные комплексы с нативным овечьим прионным белком (PrP). Формирование комплексов обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

2. молекулярной Методом динамики определены потенциальные, отрицательно заряженные сайты связывания молекулы PrP с катионными пиридилфениленовыми дендримерами: один в основной цепи белка и один в его боковой цепи. Электростатические взаимодействия реализуются между положительно заряженными пиридильными звеньями дендримеров С локально расположенными отрицательно заряженными аминокислотными остатками белка, гидрофобные - между фениленовыми фрагментами дендримера с гидрофобными группами белка.

3. Изучено влияние номера генерации (размера) дендримеров на свойства формируемых комплексов. Установлено, что с увеличением генерации дендримеров возрастают значения констант связывания, уменьшается количество молекул дендримера, способных взаимодействовать с белком. Вне зависимости от генерации образование комплексов не сопровождается изменением вторичной структуры белка.

4. Впервые продемонстрирована способность катионных пиридилфениленовых дендримеров ингибировать амилоидную агрегацию белка. Установлено, что дендримеры предотвращают как формирование небольших, но наиболее токсичных амилоидных агрегатов – олигомеров, так И зрелых амилоидных фибрилл. Ингибирование олигомеризации обусловлено дендримеров сайтом, связыванием с вовлеченным В амилоидную трансформацию прионного белка, и формированием прочных дендример-PrP, которые предотвращают как структурную комплексов конверсию приона, так и образование амилоидных фибрилл.

159

5. Эффективность ингибирования амилоидной агрегации белка зависит от генерации дендримера. Обнаружено, что наибольшую активность проявляет дендример третьей генерации, по сравнению со второй и четвертой генерациями дендримеров.

6. Продемонстрирована принципиальная возможность разрушения белковых агрегатов с помощью катионных пиридилфениленовых дендримеров. Дендримеры второй, третьей и четвертой генерации при концентрации 1мМ способны разрушать тельца включения.

7. Цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров, изученная на линиях клеток меланомы MellL и нейробластомы SH-SY5Y, ниже коммерчески доступных дендримеров - поли(амидоаминных) и поли(этилениминовых) дендримеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе синтезированы водорастворимые пиридилфениленовые дендримеры, изучены их свойства, исследована одна из возможностей их биологического применения: взаимодействие с белками. Показано, что благодаря особенностям своей структуры: постоянного заряда и жесткости, дендримеры формируют стабильные комплексы с овечьим прионным белком. Установлено, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны не только препятствовать амилоидной агрегации прионного белка, но и разрушать уже сформировавшиеся амилоидные агрегаты. Изучена соединений. Дальнейшее токсичность исследуемых направление исследований должно включать в себя проведение in vivo испытаний, а также эксперименты по поверхностной модификации дендримеров с целью снижения токсичности.

Таким образом, результаты диссертационного исследования интересны не только с фундаментальной точки зрения, но также имеют и практическую значимость.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПАМАМ полиамидоамин
- ППИ полипропиленимин
- ПЭИ полиэтиленимин
- ПЭГ полиэтиленгликоль
- ТиПСА триизопропилсилилацетилен
- МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
- ГЭБ гематоэнцефалический барьер
- МУРР малоугловое рентгеновское рассеяние
- ЯМР ядерный магнитный резонанс
- ДЛС динамическое лазерное светорассеяние
- ПЭМ просвечивающая электронная микроскопия
- КД круговой дихроизм
- G2 катионный пиридилфениленовый дендример второй генерации
- G3 катионный пиридилфениленовый дендример третьей генерации
- G4 катионный пиридилфениленовый дендример четвертой генерации
- ТВ тельца включения
- PrP прионный белок

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своим научным заведующей лабораторией макромолекулярной руководителям, химии ИНЭОС РАН, Шифриной Зинаиде Борисовне, и заведующему отделом биохимии животной клетки Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Муронцу Владимиру Израилевичу, за общее ценные советы и неоценимую возможность учиться и руководство, развиваться.

Автор выражает особую благодарность Стройловой Юлии Юрьевне и Кучкиной Нине Владимировне за помощь в постановке экспериментов и поддержку на всех этапах выполнения работы.

Автор благодарен Семенюку Павлу Игоревичу за проведение экспериментов моделированию изотермической по И титрационной калориметрии, Шевалю Евгению Валерьевичу за помощь в проведении микроскопических исследований, а также Арутюняну Александру Миграновичу за помощь в постановке экспериментов и интерпретации результатов спектроскопии кругового дихроизма.

глубоко лаборатории Автор признателен всем сотрудникам отдела биохимии макромолекулярной ХИМИИ И животной клетки 3a доброжелательное отношение, всестороннюю помощь, дружескую атмосферу и неоценимую поддержку.

Автор безгранично благодарен своей семье: своим родителям, мужу и дочке, без них выполнение настоящей работы было бы невозможным.

163

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caminade A.M., Turrin C.O., Majoral J.P. Biological properties of phosphorus dendrimers // New J Chem.- 2010.- V. 34.- № 8.- P. 1512-1524.

2. Lazniewska J., Milowska K., Gabryelak T. Dendrimers: revolutionary drugs for infectious diseases // Wires Nanomed Nanobi.- 2012.- V. 4.- № 5.- P. 469-491.

3. Mendes L.P., Pan J.Y., Torchilin V.P. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy // Molecules.- 2017.- V. 22.- № 9.- E1401.

4. Mignani S., Bryszewska M., Zablocka M., Klajnert-Maculewicz B., Cladera J., Shcharbin D., Majoral J.P. Can dendrimer based nanoparticles fight neurodegenerative diseases? Current situation versus other established approaches // Prog Polym Sci.- 2017.- V. 64.- P. 23-51.

5. Shaunak S. Perspective: Dendrimer drugs for infection and inflammation // Biochem Bioph Res Co.- 2015.- V. 468.- № 3.- P. 435-441.

Shcharbin D., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Ziemba B., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Shcharbina N., Milowska K., Ionov M., Shakhbazau A., Bryszewska M. How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo // J Control Release.- 2014.- V. 181.- P. 40-52.

 Shcharbin D., Shcharbina N., Dzmitruk V., Pedziwiatr-Werbicka E., Ionov M., Mignani S., de la Mata F.J., Gomez R., Munoz-Fernandez M.A., Majoral J.P., Bryszewska M. Dendrimer-protein interactions versus dendrimer-based nanomedicine // Colloid Surface B.- 2017.- V. 152.- P. 414-422.

8. Wu L.P., Ficker M., Christensen J.B., Trohopoulos P.N., Moghimi S.M. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges // Bioconjugate Chem.- 2015.- V. 26.- № 7.- P. 1198-1211.

9. Newkome G.R., Moorefield C.N., Voegtle F. Dendritic Molecules -Concepts, Synthesis, Perspectives: Wiley-VCH; 2002.

10. He H., Li Y., Jia X.R., Du J., Ying X., Lu W.L., Lou J.N., Wei Y. PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors // Biomaterials.- 2011.- V. 32.- № 2.- P. 478-487.

 Cheng Y.Y., Xu Z.H., Ma M.L., Xu T.W. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration // J Pharm Sci-Us.- 2008.-V. 97.- № 1.- P. 123-143.

12. Tarallo R., Carberry T.P., Falanga A., Vitiello M., Galdiero S., Galdiero M., Weck M. Dendrimers functionalized with membrane-interacting peptides for viral inhibition // Int J Nanomed.- 2013.- V. 8.-P. 521-534.

Moreno-Gonzalez I., Soto C. Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission // Semin Cell Dev Biol.- 2011. V. 22.- № 5.- P. 482-487.

14. Aguzzi A., O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives // Nat Rev Drug Discov.- 2010.- V. 9.- № 3.- P. 237-248.
15. Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification // Nat Rev Drug Discov.- 2010.- V. 9.- № 5.- P. 387-398.

16. Dawson T.M., Dawson V.L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease // Science.- 2003.- V. 302.- № 5646.- P. 819-822.

17. Prusiner S.B. The Prion Diseases // Sci Am.- 1995.- V. 272.- № 1.- P. 48-69.

18. Doig A.J., Derreumaux P. Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules // Curr Opin Struc Biol.- 2015.- V. 30.- P. 50-56.

19. Hayden E.Y., Yamin G., Beroukhim S., Chen B., Kibalchenko M., Jiang L., Ho L., Wang J., Pasinetti G.M., Teplow D.B. Inhibiting amyloid -protein assembly: Size-activity relationships among grape seed-derived polyphenols // J Neurochem.- 2015.- V. 135.- № 2.- P. 416-430.

20. Blazquez-Sanchez M.T., de Matos A.M., Rauter A.P. Exploring Anti-Prion Glyco-Based and Aromatic Scaffolds: A Chemical Strategy for the Quality of Life // Molecules.- 2017.- V. 22.- № 6.-864.

21. Ngoungoure V.L.N., Schluesener J., Moundipa P.F., Schluesener H. Natural polyphenols binding to amyloid: A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases // Mol Nutr Food Res.- 2015.- V. 59.- № 1.- P. 8-20.

22. Sgarbossa A. Natural Biomolecules and Protein Aggregation: Emerging Strategies against Amyloidogenesis // Int J Mol Sci.- 2012.- V. 13.- № 12.- P. 17121-17137.

23. Zanyatkin I., Stroylova Y., Tishina S., Stroylov V., Melnikova A., Haertle T., Muronetz V. Inhibition of Prion Propagation by 3,4-Dimethoxycinnamic Acid // Phytother Res.- 2017.- V. 31.- № 7.- P. 1046-1055.

24. Semenyuk P.I., Moiseeva E.V., Stroylova Y.Y., Lotti M., Izumrudov V.A., Muronetz V.I. Sulfated and sulfonated polymers are able to solubilize efficiently the protein aggregates of different nature // Arch Biochem Biophys.- 2015.- V. 567. - P. 22-29.

25. Ojha B., Liu H.Y., Dutta S., Rao P.P.N., Wojcikiewicz E.P., Du D.G. Poly(4styrenesulfonate) as an Inhibitor of A beta 40 Amyloid Fibril Formation // J Phys Chem B.- 2013.- V. 117.- № 45.- P. 13975-13984.

26. Tomalia D.A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry // Prog Polym Sci.- 2005.- V. 30.- № 34.- P. 294-324.

27. Tomalia D.A., Naylor A.M., Goddard W.A. Starburst Dendrimers - Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface-Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter // Angewandte Chemie-International Edition in English.- 1990.- V. 29.- № 2.- P. 138-175.

28. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. A New Class of Polymers - Starburst-Dendritic Macromolecules // Polym J.- 1985.- V. 17.- № 1.- P. 117-132.

29. Buhleier E., Wehner W., Vogtle F. Cascade-Chain-Like and Nonskid-Chain-Like Syntheses of Molecular Cavity Topologies // Synthesis-Stuttgart.- 1978.- V. - № 2.- P. 155-158. 30. Hawker C.J., Frechet J.M.J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture - a New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules // J Am Chem Soc.- 1990.- V. 112.- № 21.- P. 7638-7647.

31. Jackson C.L., Chanzy H.D., Booy F.P., Drake B.J., Tomalia D.A., Bauer B.J., Amis E.J. Visualization of dendrimer molecules by transmission electron microscopy (TEM): Staining methods and Cryo-TEM of vitrified solutions // Macromolecules.- 1998.- V. 31.- № 18.- P. 6259-6265.

32. Peterson J., Allikmaa V., Subbi J., Pehk T., Lopp M. Structural deviations in poly(amidoamine) dendrimers: a MALDI-TOF MS analysis // Eur Polym J.-2003.- V. 39.- № 1.- P. 33-42.

33. Elkin I., Banquy X., Barrett C.J., Hildgen P. Non-covalent formulation of active principles with dendrimers: Current state-of-the-art and prospects for further development // J Control Release.- 2017.- V. 264.- P. 288-305.

34. Nanaware-Kharade N., Gonzalez G.A., Lay J.O., Hendrickson H.P., Peterson E.C. Therapeutic Anti-Methamphetamine Antibody Fragment-Nanoparticle Conjugates: Synthesis and in Vitro Characterization // Bioconjugate Chem.- 2012.- V. 23.- № 9.- P. 1864-1872.

35. Poh S., Putt K.S., Low P.S. Folate-Targeted Dendrimers Selectively Accumulate at Sites of Inflammation in Mouse Models of Ulcerative Colitis and Atherosclerosis // Biomacromolecules.- 2017.- V. 18.- № 10.- P. 3082-3088.

36. Kesharwani P., Tekade R.K., Gajbhiye V., Jain K., Jain N.K. Cancer targeting potential of some ligand-anchored poly(propylene imine) dendrimers: a comparison // Nanomed-Nanotechnol.- 2011.- V. 7.- № 3.- P. 295-304.

37. McCarthy J.M., Moreno B.R., Filippini D., Komber H., Maly M., Cernescu M., Brutschy B., Appelhans D., Rogers M.S. Influence of Surface Groups on Poly(propylene imine) Dendrimers Antiprion Activity // Biomacromolecules.-2013.- V. 14.- № 1.- P. 27-37. 38. Chen W., Tomalia D.A., Thomas J.L. Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: Evidence for pH-responsive conformational changes // Macromolecules.- 2000.- V. 33.- № 25.- P. 9169-9172.

39. Cakara D., Kleimann J., Borkovec M. Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations // Macromolecules.-2003.- V. 36.- № 11.- P. 4201-4207.

40. Maiti P.K., Cagin T., Wang G.F., Goddard W.A. Structure of PAMAM dendrimers: Generations 1 through 11 // Macromolecules.- 2004.- V. 37.- № 16.- P. 6236-6254.

41. Neelov I., Falkovich S., Markelov D., Paci E., Darinskii A., Tenhu H. Molecular Dynamics of Lysine Dendrimers. Computer Simulation and Nmr // Dendrimers in Biomedical Applications.- 2013.- V. - P. 99-114.

42. Tomalia D., Baker J.R., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. A new class of polymers - starburst-dendritic macromolecules // Polym J.- 1985.- V. 17.- P. 117-132.

43. Medina S.H., El-Sayed M.E. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents // Chem Rev.- 2009.- V. 109.- № 7.- P. 3141-3157.

44. Wang W., Xiong W., Wan J., Sun X., Xu H., Yang X. The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress // Nanotechnology.- 2009.- V. 20.- № 10.- 105103.

45. Waite C.L., Sparks S.M., Uhrich K.E., Roth C.M. Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA // BMC biotechnology.- 2009.- V. 9.- P. 38-45.

46. Jain K., Kesharwani P., Gupta U., Jain N.K. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge // Int J Pharm.- 2010.- V. 394.- № 12.- P. 122-142.

47. Kang C., Yuan X., Li F., Pu P., Yu S., Shen C., Zhang Z., Zhang Y. Evaluation of folate-PAMAM for the delivery of antisense oligonucleotides to rat C6 glioma cells in vitro and in vivo // Journal of biomedical materials research Part A.-2010.- V. 93.- № 2.- P. 585-594.

48. Marcinkowska M., Sobierajska E., Stanczyk M., Janaszewska A., Chworos A., Klajnert-Maculewicz B. Conjugate of PAMAM Dendrimer, Doxorubicin and Monoclonal Antibody-Trastuzumab: The New Approach of a Well-Known Strategy // Polymers-Basel.- 2018.- V. 10.- № 2.- 187

49. Luong D., Sau S., Kesharwani P., Iyer A.K. Polyvalent Folate-Dendrimer-Coated Iron Oxide Theranostic Nanoparticles for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Precise Cancer Cell Targeting // Biomacromolecules.-2017.- V. 18.- № 4.- P. 1197-1209.

50. Bhadra D., Yadav A.K., Bhadra S., Jain N.K. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting // Int J Pharmaceut.- 2005.- V. 295.- № 12.- P. 221-233.

51. Gorzkiewicz M., Jatczak-Pawlik I., Studzian M., Pulaski L., Appelhans D., Voit B., Klajnert-Maculewicz B. Glycodendrimer Nanocarriers for Direct Delivery of Fludarabine Triphosphate to Leukemic Cells: Improved Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fludarabine // Biomacromolecules.- 2018.- V. 19.- № 2.- P. 531-543.

52. Franiak-Pietryga I., Ostrowska K., Maciejewski H., Appelhans D., Misiewicz M., Ziemba B., Bednarek M., Bryszewska M., Borowiec M. PPI-G4 Glycodendrimers Upregulate TRAIL-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells // Macromolecular Bioscience.- 2017.- V. 17.- № 5.- P.189-195

53. Garcia-Gallego S., Diaz L., Jimenez J.L., Gomez R., de la Mata F.J., Munoz-Fernandez M.A. HIV-1 antiviral behavior of anionic PPI metallo-dendrimers with EDA core // Eur J Med Chem.- 2015.- V. 98. - P. 139-148.

54. Rengan K., Engel R. Phosphonium Cascade Molecules // J Chem Soc Chem Comm.- 1990.- V. 16.- P. 1084-1085.

55. Launay N., Caminade A.M., Lahana R., Majoral J.P. A General Synthetic Strategy for Neutral Phosphorus-Containing Dendrimers // Angewandte Chemie-International Edition in English.- 1994.- V. 33.- № 15-16.- P. 1589-1592.

56. Launay N., Caminade A.M., Majoral J.P. Synthesis and Reactivity of Unusual Phosphorus Dendrimers - a Useful Divergent Growth Approach up to the 7th Generation // J Am Chem Soc.- 1995.- V. 117.- № 11.- P. 3282-3293.

57. Lartigue M.L., Donnadieu B., Galliot C., Caminade A.M., Majoral J.P., Fayet J.P. Large dipole moments of phosphorus-containing dendrimers // Macromolecules.- 1997.- V. 30.- № 23.- P. 7335-7347.

58. Launay N., Caminade A.M., Majoral J.P. Synthesis of bowl-shaped dendrimers from generation 1 to generation 8 // J Organomet Chem.- 1997.- V. 529.- № 12.- P. 51-58.

59. Shakhbazau A.V., Shcharbin D.G., Goncharova N.V., Seviaryn I.N., Kosmacheva S.M., Kartel N.A., Bryszewska M., Majoral J.P., Potapnev M.P. Neurons and Stromal Stem Cells as Targets for Polycation-Mediated Transfection // B Exp Biol Med+.- 2011.- V. 151.- № 1.- P. 126-139.

60. Ottaviani M.F., Mazzeo R., Cangiotti M., Fiorani L., Majoral J.P., Caminade A.M., Pedziwiatr E., Bryszewska M., Klajnert B. Time Evolution of the Aggregation Process of Peptides Involved in Neurodegenerative Diseases and Preventing Aggregation Effect of Phosphorus Dendrimers Studied by EPR // Biomacromolecules.- 2010.- V. 11.- № 11.- P. 3014-3021.

61. Blanzat M., Turrin C.O., Aubertin A.M., Couturier-Vidal C., Caminade A.M., Majoral J.P., Rico-Lattes I., Lattes A. Dendritic catanionic assemblies: In vitro anti-HIV activity of phosphorus-containing dendrimers bearing Gal beta(1)cer analogues // Chembiochem.- 2005.- V. 6.- № 12.- P. 2207-2213.

62. Spataro G., Malecaze F., Turrin C.O., Soler V., Duhayon C., Elena P.P., Majoral J.P., Caminade A.M. Designing dendrimers for ocular drug delivery // Eur J Med Chem.- 2010.- V. 45.- № 1.- P. 326-334.

63. Mongin O., Rouxel C., Robin A.C., Pla-Quintana A., Krishna T.R., Recher G., Tiaho F., Caminade A.M., Majoral J.P., Blanchard-Desce M. Brilliant organic nanodots: novel nano-objects for bionanophotonics // Proc Spie.- 2008.- V. 7040.- P.156-164.

64. Hayder M., Poupot M., Baron M., Nigon D., Turrin C.O., Caminade A.M., Majoral J.P., Eisenberg R.A., Fournie J.J., Cantagrel A., Poupot R., Davignon J.L. A Phosphorus-Based Dendrimer Targets Inflammation and Osteoclastogenesis in Experimental Arthritis // Sci Transl Med.- 2011.- V. 3.- № 81.- P. 89-98.

65. Degboe Y., Fruchon S., Baron M., Nigon D., Turrin C.O., Caminade A.M., Poupot R., Cantagrel A., Davignon J.L. Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent // Arthritis Res Ther.- 2014.- V. 16.- № 2.- P. 324-331.

66. Bosch X. Dendrimers To Treat Rheumatoid Arthritis // Acs Nano.- 2011.- V. 5.- № 9.- P. 6779-6785.

67. Denkewalter R.G., Kolc, J., Lukasavage, W. J. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. USA1981.

68. Roy R., Zanini D., Meunier S.J., Romanowska A. Synthesis and Antigenic Properties of Sialic-Acid Based Dendrimers // Acs Sym Ser.- 1994.- V. 560. - P. 104-119.

69. Rupp R., Rosenthal S.L., Stanberry L.R. VivaGel (TM) (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer microbicide for the prevention of HIV and HSV infection // Int J Nanomed.- 2007.- V. 2.- N_{2} 4.- P. 561-576.

70. Telwatte S., Moore K., Johnson A., Tyssen D., Sterjovski J., Aldunate M., Gorry P.R., Ramsland P.A., Lewis G.R., Paull J.R.A., Sonza S., Tachedjian G. Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1 // Antivir Res.- 2011.- V. 90.- № 3.- P. 195-209.

71. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vivagel.

72. Ortega P., Serramia M.J., Munoz-Fernandez M.A., de la Mata F.J., Gomez R. Globular carbosilane dendrimers with mannose groups at the periphery: synthesis, characterization and toxicity in dendritic cells // Tetrahedron.- 2010.- V. 66.- № 18.- P. 3326-3331.

73. Ionov M., Ciepluch K., Garaiova Z., Melikishvili S., Michlewska S., Balcerzak L., Glinska S., Milowska K., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Shcharbin D., Waczulikova I., Bryszewska M., Hianik T. Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers // Bba-Biomembranes.-2015.- V. 1848.- № 4.- P. 907-915.

74. Gutierrez-Ulloa C.E., Buyanova M.Y., Apartsin E.K., Venyaminova A.G., de la Mata F.J., Valiente M., Gomez R. Amphiphilic carbosilane dendrons as a novel synthetic platform toward micelle formation // Org Biomol Chem.- 2017.- V. 15.- № 35.- P. 7352-7364.

75. Shcharbin D., Szwedzka M., Bryszewska M. Does fluorescence of ANS reflect its binding to PAMAM dendrimer? // Bioorg Chem.- 2007.- V. 35.- № 2.- P. 170-184.

76. Milowska K., Szwed A., Mutrynowska M., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Gabryelak T., Bryszewska M. Carbosilane dendrimers inhibit alpha-synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage // Int J Pharmaceut.-2015.- V. 484.- № 12.- P. 268-275.

77. Sharma R., Kottari N., Chabre Y.M., Abbassi L., Shiao T.C., Roy R. A highly versatile convergent/divergent "onion peel" synthetic strategy toward potent multivalent glycodendrimers // Chem Commun.- 2014.- V. 50.- № 87.- P. 13300-13313.

78. Sharma R., Naresh K., Chabre Y.M., Rej R., Saadeh N.K., Roy R. "Onion peel" dendrimers: a straightforward synthetic approach towards highly diversified architectures // Polym Chem-Uk.- 2014.- V. 5.- № 14.- P. 4321-4331.

79. Sharma R., Zhang I., Abbassi L., Rej R., Maysinger D., Roy R. A fast track strategy toward highly functionalized dendrimers with different structural layers: an "onion peel approach" // Polym Chem-Uk.- 2015.- V. 6.- № 9.- P. 1436-1444.

80. Roy R., Shiao T.C. Glyconanosynthons as powerful scaffolds and building blocks for the rapid construction of multifaceted, dense and chiral dendrimers // Chem Soc Rev.- 2015.- V. 44.- № 12.- P. 3924-3941.

81. Moreno S., Szwed A., El Brahmi N., Milowska K., Kurowska J., Fuentes-Paniagua E., Pedziwiatr-Werbicka E., Gabryelak T., Katir N., de la Mata F.J., Munoz-Fernandez M.A., Gomez-Ramirez R., Caminade A.M., Majoral J.P., Bryszewska M. Synthesis, characterization and biological properties of new hybrid carbosilane-viologen-phosphorus dendrimers // Rsc Adv.- 2015.- V. 5.- № 33.- P. 25942-25958.

82. Munoz A., Sigwalt D., Illescas B.M., Luczkowiak J., Rodriguez-Perez L., Nierengarten I., Holler M., Remy J.S., Buffet K., Vincent S.P., Rojo J., Delgado R., Nierengarten J.F., Martin N. Synthesis of giant globular multivalent glycofullerenes as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection // Nat Chem.- 2016.- V. 8.- № 1.- P. 50-57.

83. Luczkowiak J., Munoz A., Sanchez-Navarro M., Ribeiro-Viana R., Ginieis A., Illescas B.M., Martin N., Delgado R., Rojo J. Glycofullerenes Inhibit Viral Infection // Biomacromolecules.- 2013.- V. 14.- № 2.- P. 431-447.

84. Nierengarten I., Nierengarten J.F. Fullerene Sugar Balls: A New Class of Biologically Active Fullerene Derivatives // Chem-Asian J.- 2014.- V. 9.- № 6.- P. 1436-1444.

85. Sanchez-Navarro M., Munoz A., Illescas B.M., Rojo J., Martin N. [60]Fullerene as Multivalent Scaffold: Efficient Molecular Recognition of Globular Glycofullerenes by Concanavalin A // Chem-Eur J.- 2011.- V. 17.- № 3.-P. 766-779.

86. Durka M., Buffet K., Iehl J., Holler M., Nierengarten J.F., Taganna J., Bouckaert J., Vincent S.P. The functional valency of dodecamannosylated fullerenes with Escherichia coli FimH-towards novel bacterial antiadhesives // Chem Commun.- 2011.- V. 47.- № 4.- P. 1321-1333.

87. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J Immunol Methods.- 1983.-V. 65.- № 12.- P. 55-63. 88. Jevprasesphant R., Penny J., Jalal R., Attwood D., McKeown N.B., D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers // Int J Pharmaceut.- 2003.- V. 252.- № 12.- P. 263-276.

89. Fischer D., Li Y.X., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. // Biomaterials.- 2003.- V. 24.- № 7.- P. 1121-1131.

90. Zinselmeyer B.H., Mackay S.P., Schatzlein A.G., Uchegbu I.F. The lowergeneration polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents // Pharmaceutical research.- 2002.- V. 19.- № 7.- P. 960-967.

91. Malik N., Wiwattanapatapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener J.W., Meijer E.W., Paulus W., Duncan R. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of I-125-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo // J Control Release.- 2000.- V. 68.- № 2.- P. 299-302.

92. El-Sayed M., Ginski M., Rhodes C., Ghandehari H. Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers // J Control Release.-2002.- V. 81.- № 3.- P. 355-365.

93. Mannisto M., Vanderkerken S., Toncheva V., Elomaa M., Ruponen M., Schacht E., Urtti A. Structure-activity relationships of poly(L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery // J Control Release.- 2002.- V. 83.- № 1.- P. 169-182.

94. Kim T., Seo H.J., Choi J.S., Jang H.S., Baek J., Kim K., Park J.S. PAMAM-PEG-PAMAM: Novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier // Biomacromolecules.- 2004.- V. 5.- № 6.- P. 2487-2492.

95. Qi R., Gao Y., Tang Y., He R.R., Liu T.L., He Y., Sun S., Li B.Y., Li Y.B., Liu G. PEG-conjugated PAMAM Dendrimers Mediate Efficient Intramuscular Gene Expression // Aaps J.- 2009.- V. 11.- № 3.- P. 395-405.

96. Tack F., Bakker A., Maes S., Dekeyser N., Bruining M., Elissen-Roman C., Janicot M., Janssen H.M., De Waal B.F.M., Fransen P.M., Lou X., Meijer E.W.,

Arien A., Brewster M.E. Dendrimeric poly(propylene-imines) as effective delivery agents for DNAzymes: Dendrimer synthesis, stability and oligonucleotide complexation // J Control Release.- 2006.- V. 116.- № 2.- P. E24-E6.

97. Tack F., Bakker A., Maes S., Dekeyser N., Bruining M., Elissen-Roman C., Janicot M., Janssen H.M., De Waal B.F.M., Fransen P.M., Lou X., Meijer E.W., Arien A., Brewster M.E. Dendrimeric poly(propylene-imines) as effective delivery agents for DNAzymes: Toxicity, in vitro transfection and in vivo delivery // J Control Release.- 2006.- V. 116.- № 2.- P. E26-E8.

98. Lim Y.B., Mays C.E., Kim Y., Titlow W.B., Ryou C. The inhibition of prions through blocking prion conversion by permanently charged branched polyamines of low cytotoxicity // Biomaterials.- 2010.- V. 31.- № 8.- P. 2025-2033.

99. Lee J.H., Lim Y.B., Choi J.S., Lee Y., Kim T.I., Kim H.J., Yoon J.K., Kim K., Park J.S. Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency // Bioconjugate Chem.- 2003.- V. 14.- № 6.- P. 1214-1221.

100. Choi J.S., Ko K.S., Park J.S., Kim Y.H., Kim S.W., Lee M. Dexamethasone conjugated poly(amidoamine) dendrimer as a gene carrier for efficient nuclear translocation // Int J Pharmaceut.- 2006.- V. 320.- № 12.- P. 171-178.

101. Kono K., Akiyama H., Takahashi T., Takagishi T., Harada A. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery // Bioconjugate Chem.- 2005.- V. 16.- № 1.- P. 208-214.

102. Shieh M.J., Peng C.L., Lou P.J., Chiu C.H., Tsai T.Y., Hsu C.Y., Yeh C.Y., Lai P.S. Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates // J Control Release.- 2008.- V. 129.- № 3.- P. 200-206.

103. Kim T.I., Bai C.Z., Nam K., Park J.S. Comparison between arginine conjugated PAMAM dendrimers with structural diversity for gene delivery systems // J Control Release.- 2009.- V. 136.- № 2.- P. 132-139.

104. Choi J.S., Nam K., Park J., Kim J.B., Lee J.K., Park J. Enhanced transfection efficiency of PAMAM dendrimer by surface modification with L-arginine // J Control Release.- 2004.- V. 99.- № 3.- P. 445-456.

105. Nam H.Y., Nam K., Hahn H.J., Kim B.H., Lim H.J., Kim H.J., Choi J.S., Park J.S. Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity // Biomaterials.- 2009.- V. 30.- № 4.- P. 665-673.

106. Zhang X.Q., Wang X.L., Huang S.W., Zhuo R.X., Liu Z.L., Mao H.Q., Leong K.W. In vitro gene delivery using polyamidoamine dendrimers with a trimesyl core // Biomacromolecules.- 2005.- V. 6.- № 1.- P. 341-350.

107. Mukherjee S.P., Davoren M., Byrne H.J. In vitro mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers - Towards quantitative structure activity relationships // Toxicol in Vitro.- 2010.- V. 24.- № 1.- P. 169-177.

108. Huang K.T., Chen Y.H., Walker A.M. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids // Biotechniques.-2004.- V. 37.- № 3.- P. 406--413.

109. Hall A., Larsen A.K., Parhamifar L., Meyle K.D., Wu L.P., Moghimi S.M. High resolution respirometry analysis of polyethylenimine-mediated mitochondrial energy crisis and cellular stress: Mitochondrial proton leak and inhibition of the electron transport system // Bba-Bioenergetics.- 2013.- V. 1827.- № 10.- P. 1213-1225.

110. Hall A., Parhamifar L., Lange M.K., Meyle K.D., Sanderhoff M., Andersen H., Roursgaard M., Larsen A.K., Jensen P.B., Christensen C., Bartek J., Moghimi S.M. Polyethylenimine architecture-dependent metabolic imprints and perturbation of cellular redox homeostasis // Bba-Bioenergetics.- 2015.- V. 1847.- № 3.- P. 328-342.

111. Parhamifar L., Andersen H., Wu L.P., Hall A., Hudzech D., Moghimi S.M.Polycation-Mediated Integrated Cell Death Processes // Adv Genet.- 2014.- V. 88.-P. 353-398.

112. Perumal O.P., Inapagolla R., Kannan S., Kannan R.M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers // Biomaterials.- 2008.- V. 29.- № 24-25.- P. 3469-3476.

113. Albertazzi L., Serresi M., Albanese A., Beltram F. Dendrimer Internalization and Intracellular Trafficking in Living Cells // Mol Pharmaceut.- 2010.- V. 7.- №
3.- P. 680-688.

114. Kitchens K.M., Foraker A.B., Kolhatkar R.B., Swaan P.W., Ghandehari H. Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells // Pharm Res.- 2007.- V. 24.- № 11.- P. 2138-2145.

115. Lee J.H., Cha K.E., Kim M.S., Hong H.W., Chung D.J., Ryu G., Myung H. Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction // Toxicol Lett.- 2009.- V. 190.- № 2.- P. 202-207.

116. Mukherjee S.P., Lyng F.M., Garcia A., Davoren M., Byrne H.J. Mechanistic studies of in vitro cytotoxicity of poly(amidoamine) dendrimers in mammalian cells // Toxicol Appl Pharm.- 2010.- V. 248.- № 3.- P. 259-268.

117. Petit A.N., Debenest T., Eullaffroy P., Gagne F. Effects of a cationic PAMAM dendrimer on photosynthesis and ROS production of Chlamydomonas reinhardtii // Nanotoxicology.- 2012.- V. 6.- № 3.- P. 315-326.

118. Dai H., Navath R.S., Balakrishnan B., Guru B.R., Mishra M.K., Romero R., Kannan R.M., Kannan S. Intrinsic targeting of inflammatory cells in the brain by polyamidoamine dendrimers upon subarachnoid administration // Nanomedicine-Uk.- 2010.- V. 5.- № 9.- P. 1317-1329.

119. Kannan S., Dai H., Navath R.S., Balakrishnan B., Jyoti A., Janisse J., Romero R., Kannan R.M. Dendrimer-Based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model // Sci Transl Med.- 2012.- V. 4.- № 130.- P. 1788-1795.

120. Roberts J.C., Bhalgat M.K., Zera R.T. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst(TM) dendrimers // J Biomed Mater Res.-1996.- V. 30.- № 1.- P. 53-65. 121. Karolczak K., Rozalska S., Wieczorek M., Labieniec-Watala M., Watala C. Poly(amido)amine dendrimers generation 4.0 (PAMAM G4) reduce blood hyperglycaemia and restore impaired blood-brain barrier permeability in streptozotocin diabetes in rats // Int J Pharmaceut.- 2012.- V. 436.- № 12.- P. 508-518.

122. Ziemba B., Janaszewska A., Ciepluch K., Krotewicz M., Fogel W.A., Appelhans D., Voit B., Bryszewska M., Klajnert B. In vivo toxicity of poly(propyleneimine) dendrimers // Journal of Biomedical Materials Research Part A.- 2011.- V. 99A.- № 2.- P. 261-268.

123. Pardridge W.M. Drug transport across the blood-brain barrier // J Cerebr Blood F Met.- 2012.- V. 32.- № 11.- P. 1959-1972.

124. Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S., Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? // Int J Pharmaceut.- 2005.- V. 298.- № 2.- P. 274-292.

125. Boado R.J., Pardridge W.M. Genetic engineering of IgG-glucuronidase fusion proteins // J Drug Target.- 2010.- V. 18.- № 3.- P. 205-211.

126. Janaszewska A., Ziemba B., Ciepluch K., Appelhans D., Voit B., Klajnert B., Bryszewska M. The biodistribution of maltotriose modified poly(propylene imine) (PPI) dendrimers conjugated with fluorescein-proofs of crossing blood-brain-barrier // New J Chem.- 2012.- V. 36.- № 2.- P. 350-363.

127. Klementieva O., Aso E., Filippini D., Benseny-Cases N., Carmona M., Juves S., Appelhans D., Cladera J., Ferrer I. Effect of Poly(propylene imine) Glycodendrimers on beta-Amyloid Aggregation in Vitro and in APP/PS1 Transgenic Mice, as a Model of Brain Amyloid Deposition and Alzheimer's Disease // Biomacromolecules.- 2013.- V. 14.- № 10.- P. 3570-3580.

128. Adkins J.N., Varnum S.M., Auberry K.J., Moore R.J., Angell N.H., Smith R.D., Springer D.L., Pounds J.G. Toward a human blood serum proteome - Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry // Mol Cell Proteomics.- 2002.- V. 1.- № 12.- P. 947-955.

129. Shen Y.F., Kim J., Strittmatter E.F., Jacobs J.M., Camp D.G., Fang R.H., Tolie N., Moore R.J., Smith R.D. Characterization of the human blood plasma proteome // Proteomics.- 2005.- V. 5.- № 15.- P. 4034-4045.

130. Schutzer S.E., Liu T., Natelson B.H., Angel T.E., Schepmoes A.A., Purvine S.O., Hixson K.K., Lipton M.S., Camp D.G., Coyle P.K., Smith R.D., Bergquist J. Establishing the Proteome of Normal Human Cerebrospinal Fluid // Plos One.-2010.- V. 5.- № 6.- P.E891.

131. Ottaviani M.F., Jockusch S., Turro N.J., Tomalia D.A., Barbon A. Interactions of dendrimers with selected amino acids and proteins studied by continuous wave EPR and Fourier transform EPR // Langmuir.- 2004.- V. 20.- № 23.- P. 10238-10245.

132. Shcharbin D., Klajnert B., Bryszewska M. The effect of PAMAM dendrimers on human and bovine serum albumin at different pH and NaCl concentrations // J Biomat Sci-Polym E.- 2005.- V. 16.- № 9.- P. 1081-1093.

133. Chiba T., Yoshimura T., Esumi K. Physicochemical properties of aqueous mixed solutions of sugar-persubstituted poly(amidoamine)dendrimers and bovine serum albumin // Colloid Surface A.- 2003.- V. 214.- № 13.- P. 157-165.

134. Froehlich E., Mandeville J.S., Jennings C.J., Sedaghat-Herati R., Tajmir-Riahi H.A. Dendrimers Bind Human Serum Albumin // J Phys Chem B.- 2009.- V. 113.-№ 19.- P. 6986-6993.

135. Shcharbin D., Ottaviani M.F., Cangiotti M., Przybyszewska M., Zaborski M., Bryszewska M. Impact of PAMAM G2 and G6 dendrimers on bovine serum albumin (fatty acids free and loaded with different fatty acids) // Colloid Surface B.- 2008.- V. 63.- № 1.- P. 27-33.

136. Gabellieri E., Strambini G.B., Shcharbin D., Klajnert B., Bryszewska M.
Dendrimer-protein interactions studied by tryptophan room temperature phosphorescence // Bba-Proteins Proteom.- 2006.- V. 1764.- № 11.- P. 1750-1756.
137. Melikishvili S., Milowska L., Rodacka A., Ionov M., Garaiova Z., Waczulikova I., Majoral J.P., Bryszewska M., Hianik T. The interaction of

dendrimers complexed with HIV-derived peptides with lipid membranes // Eur Biophys J Biophy.- 2015.- V. 44.- P. S196

138. Shcharbin D., Klajnert B., Mazhul V., Bryszewska M. Dendrimer interactions with hydrophobic fluorescent probes and human serum albumin // J Fluoresc.-2005.- V. 15.- № 1.- P. 21-28.

139. Sekowski S., Buczkowski A., Palecz B., Gabryelak T. Interaction of polyamidoamine (PAMAM) succinamic acid dendrimers generation 4 with human serum albumin // Spectrochim Acta A.- 2011.- V. 81.- № 1.- P. 706-710.

140. Zhang H.M., Lou K., Cao J., Wang Y.Q. Interaction of a Hydrophobic-Functionalized PAMAM Dendrimer with Bovine Serum Albumin: Thermodynamic and Structural Changes // Langmuir.- 2014.- V. 30.- № 19.- P. 5536-5544.

141. Klajnert B., Stanislawska L., Bryszewska M., Palecz B. Interactions between
PAMAM dendrimers and bovine serum albumin // Bba-Proteins Proteom.- 2003.V. 1648.- № 12.- P. 115-126.

142. Shcharbin D., Jokiel M., Klajnert B., Bryszewska M. Effect of dendrimers on pure acetylcholinesterase activity and structure // Bioelectrochemistry.- 2006.- V. 68.- № 1.- P. 56-59.

143. Giehm L., Christensen C., Boas U., Heegaard P.A.H., Otzen D.E. Dendrimers destabilize proteins in a generation-dependent manner involving electrostatic interactions // Biopolymers.- 2008.- V. 89.- № 6.- P. 522-529.

144. Shcharbin D., Ionov M., Abashkin V., Loznikova S., Dzmitruk V., Shcharbina N., Matusevich L., Milowska K., Galecki K., Wysocki S., Bryszewska M. Nanoparticle corona for proteins: mechanisms of interaction between dendrimers and proteins // Colloid Surface B.- 2015.- V. 134.- P. 377-383.

145. Ruenraroengsak P., Florence A.T. Biphasic interactions between a cationic dendrimer and actin // J Drug Target.- 2010.- V. 18.- № 10.- P. 803-811.
146. Shukla D., Schneider C.P., Trout B.L. Effects of PAMAM Dendrimer Salt Solutions on Protein Stability // J Phys Chem Lett.- 2011.- V. 2.- № 14.- P. 1782-1788.

147. Ciolkowski M., Palecz B., Appelhans D., Voit B., Klajnert B., Bryszewska M. The influence of maltose modified poly(propylene imine) dendrimers on hen egg white lysozyme structure and thermal stability // Colloid Surface B.- 2012.- V. 95. P. 103-108.

148. Ciolkowski M., Halets I., Shcharbin D., Appelhans D., Voit B., Klajnert B., Bryszewska M. Impact of maltose modified poly(propylene imine) dendrimers on liver alcohol dehydrogenase (LADH) internal dynamics and structure // New J Chem.- 2012.- V. 36.- № 10.- P. 1992-1999.

149. Ionov M., Ihnatsyeu-Kachan A., Michlewska S., Shcharbina N., Shcharbin D., Majoral J.P., Bryszewska M. Effect of dendrimers on selected enzymes-Evaluation of nano carriers // Int J Pharmaceut.- 2016.- V. 499.- № 12.- P. 247-254.

150. Giri J., Diallo M.S., Simpson A.J., Liu Y., Goddard W.A., Kumar R., Woods G.C. Interactions of Poly(amidoamine) Dendrimers with Human Serum Albumin: Binding Constants and Mechanisms // Acs Nano.- 2011.- V. 5.- № 5.- P. 3456-3468.

151. Gupta A.N., Bohidar H.B., Aswal V.K. Surface patch binding induced intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of similarly charged gelatin-chitosan molecules // J Phys Chem B.- 2007.- V. 111.- № 34.- P. 10137-10145.

152. Wang S., Chen K., Li L., Guo X. Binding between proteins and cationic spherical polyelectrolyte brushes: effect of pH, ionic strength, and stoichiometry // Biomacromolecules.- 2013.- V. 14.- № 3.- P. 818-827.

153. Sofronova A.A., Izumrudov V.A., Muronetz V.I., Semenyuk P.I. Similarly charged polyelectrolyte can be the most efficient suppressor of the protein aggregation // Polymer.- 2017.- V. 108.- P. 281-287.

154. Heegaard P.M.H., Pedersen H.G., Flink J., Boas U. Amyloid aggregates of the prion peptide PrP106-126 are destabilised by oxidation and by the action of dendrimers // Febs Lett.- 2004.- V. 577.- № 12.- P. 127-133.

155. Camarada M.B., Marquez-Miranda V., Araya-Duran I., Yevenes A., Gonzalez-Nilo F. PAMAM G4 dendrimers as inhibitors of the iron storage properties of human L-chain ferritin // Physical chemistry chemical physics - 2015.- V. 17.- № 29.- P. 19001-19011.

156. Martinho N., Florindo H., Silva L., Brocchini S., Zloh M., Barata T. Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications // Molecules.- 2014.- V. 19.- № 12.- P. 20424-20467.

157. Chen W., Tomalia D.A., Thomas J.L. Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes // Macromolecules.- 2000.- V. 33. - P. 9169-9172.

158. Cakara D., Kleimann J., Borkovec M. Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations // Macromolecules.-2003.- V. 36.- P. 4201-4207.

159. Nowacka O., Shcharbin D., Klajnert-Maculewicz B., Bryszewska M. Stabilizing effect of small concentrations of PAMAM dendrimers at the insulin aggregation // Colloid Surface B.- 2014.- V. 116. - P. 757-765.

160. Shcharbin D., Shcharbina N., Milowska K., de la Mata F.J., Munoz-Fernandez M.A., Mignani S., Gomez-Ramirez R., Majoral J.P., Bryszewska M. Interference of cationic polymeric nanoparticles with clinical chemistry tests-Clinical relevance // Int J Pharmaceut.- 2014.- V. 473.- № 12.- P. 599-606.

161. Ionov M., Ihnatsyeu-Kachan A., Michlewska S., Shcharbina N., Shcharbin D.,
Majoral J.P., Bryszewska M. Effect of dendrimers on selected enzymes-Evaluation of nano carriers // Int J Pharm.- 2016.- V. 499.- № 12.- P. 247-254.

162. Ciolkowski M., Rozanek M., Szewczyk M., Klajnert B., Bryszewska M. The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases // Bba-Biomembranes.- 2011.- V. 1808.- № 11.- P. 2714-2723.

163. Холмуродов Х.Т., Алтайский М.В., Пузынин И.В., Дардин Т., Филатов Ф.П. Методы молекулярной динамики для моделирования физических и биологических процессов // Физика элементарных частиц и атомного ядра.-2003.- V. 34.- № 2.- Р. 472-515.

164. Furlan S., La Penna G., Appelhans D., Cangiotti M., Ottaviani M.F., Danani A. Combined EPR and Molecular Modeling Study of PPI Dendrimers Interacting with Copper Ions: Effect of Generation and Maltose Decoration // J Phys Chem B.-2014.- V. 118.- № 42.- P. 12098-12111.

165. Tian W.D., Ma Y.Q. Theoretical and computational studies of dendrimers as delivery vectors // Chem Soc Rev.- 2013.- V. 42.- № 2.- P. 705-727.

166. Schneider C.P., Shukla D., Trout B.L. Effects of Solute-Solute Interactions on Protein Stability Studied Using Various Counterions and Dendrimers // Plos One.-2011.- V. 6.- № 11.- P.E824.

167. Mason P.E., Neilson G.W., Dempsey C.E., Barnes A.C., Cruickshank J.M. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution // P Natl Acad Sci USA.- 2003.- V. 100.- № 8.- P. 4557-4561.

168. Barata T.S., Teo I., Brocchini S., Zloh M., Shaunak S. Partially Glycosylated Dendrimers Block MD-2 and Prevent TLR4-MD-2-LPS Complex Mediated Cytokine Responses // Plos Comput Biol.- 2011.- V. 7.- № 6.- P. E189.

169. Gonzalez-Garcia E., Maly M., de la Mata F.J., Gomez R., Marina M.L., Garcia M.C. Factors affecting interactions between sulphonate-terminated dendrimers and proteins: A three case study // Colloid Surface B.- 2017.- V. 149.- P. 196-205.

170. Gajbhiye V., Palanirajan V.K., Tekade R.K., Jain N.K. Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review // J Pharm Pharmacol.- 2009.- V. 61.- № 8.- P. 989-1003.

171. Dobson C.M. Protein folding and misfolding // Nature.- 2003.- V. 426.- № 6968.- P. 884-890.

172. Eichner T., Radford S.E. A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold // Mol Cell.- 2011.- V. 43.- № 1.- P. 8-18.

173. Pellarin R., Guarnera E., Caflisch A. Pathways and intermediates of amyloid fibril formation // J Mol Biol.- 2007.- V. 374.- № 4.- P. 917-924.

174. Stohr J., Weinmann N., Wille H., Kaimann T., Nagel-Steger L., Birkmann E., Panza G., Prusiner S.B., Eigen M., Riesner D. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid // P Natl Acad Sci USA.- 2008.- V. 105.- № 7.- P. 2409-2414.

175. Eichner T., Kalverda A.P., Thompson G.S., Homans S.W., Radford S.E. Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution // Mol Cell.- 2011.- V. 41.- № 2.- P. 161-172.

176. Benseny-Cases N., Cocera M., Cladera J. Conversion of non-fibrillar betasheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation // Biochem Bioph Res Co.- 2007.- V. 361.- № 4.- P. 916-921.

177. Eghiaian F., Daubenfeld T., Quenet Y., van Audenhaege M., Bouin A.P., van der Rest G., Grosclaude J., Rezaei H. Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage // P Natl Acad Sci USA.- 2007.- V. 104.- № 18.- P. 7414-7419.

178. Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F., Tycko R. A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR // P Natl Acad Sci USA.- 2002.- V. 99.- № 26.- P. 16742-16747.

179. Der-Sarkissian A., Jao C.C., Chen J., Langen R. Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling // J Biol Chem.- 2003.- V. 278.- № 39.- P. 37530-37545.

180. Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C.F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction // J Mol Biol.- 1997.- V. 273.- № 3.- P. 729-739. 181. Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., Tzitzilonis C., Soragni A., Jessberger S., Mira H., Consiglio A., Pham E., Masliah E., Gage F.H., Riek R. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic // P Natl Acad Sci USA.- 2011.- V. 108.- № 10.- P. 4194-4199.

182. Mroczko B., Groblewska M., Litman-Zawadzka A., Kornhuber J., Lewczuk
P. Amyloid beta oligomers (A beta Os) in Alzheimer's disease // J Neural Transm.2018.- V. 125.- № 2.- P. 177-191.

183. Nagel-Steger L., Owen M.C., Strodel B. An Account of Amyloid Oligomers:
Facts and Figures Obtained from Experiments and Simulations // Chembiochem.2016.- V. 17.- № 8.- P. 657-676.

184. Rezaei H., Eghiaian F., Perez J., Doublet N., Choiset Y., Haertle T., Grosclaude J. Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities // J Mol Biol.-2005.- V. 347.- № 3.- P. 665-679.

185. Redecke L., von Bergen M., Clos J., Konarev P.V., Svergun D.I., Fittschen U.E.A., Broekaert J.A.C., Bruns O., Georgieva D., Mandelkow E., Genov N., Betzel C. Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro // J Struct Biol.- 2007.- V. 157.- N_{2} 2.- P. 308-320.

186. Ryan T.M., Kirby N., Mertens H.D.T., Roberts B., Barnham K.J., Cappai R., Pham C.L.L., Masters C.L., Curtain C.C. Small angle X-ray scattering analysis of Cu2+-induced oligomers of the Alzheimer's amyloid beta peptide // Metallomics.-2015.- V. 7.- № 3.- P. 536-543.

187. Riek R., Hornemann S., Wider G., Glockshuber R., Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231) // Febs Lett.- 1997.- V. 413.- № 2.- P. 282-288.

188. Hornemann S., Schorn C., Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains // Embo Rep.- 2004.- V. 5.- № 12.- P. 1159-1164.

189. Bujdoso R., Burke D.F., Thackray A.M. Structural differences between allelic variants of the ovine prion protein revealed by molecular dynamics simulations // Proteins.- 2005.- V. 61.- № 4.- P. 840-849.

190. Gossert A.D., Bonjour S., Lysek D.A., Fiorito F., Wuthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids // P Natl Acad Sci USA.- 2005.- V. 102.- № 3.- P. 646-653.

191. Huang Z.W., Gabriel J.M., Baldwin M.A., Fletterick R.J., Prusiner S.B., Cohen F.E. Proposed 3-Dimensional Structure for the Cellular Prion Protein // P Natl Acad Sci USA.- 1994.- V. 91.- № 15.- P. 7139-7143.

192. Baldwin M.A., Pan K.M., Nguyen J., Huang Z.W., Groth D., Serban A., Gasset M., Mehlhorn I., Fletterick R.J., Cohen F.E., Prusiner S.B. Spectroscopic Characterization of Conformational Differences between Prpc and Prpsc - an Alpha-Helix to Beta-Sheet Transition // Philos T Roy Soc B.- 1994.- V. 343.- № 1306.- P. 435-441.

193. Wasmer C., Lange A., Van Melckebeke H., Siemer A.B., Riek R., Meier B.H. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core // Science.- 2008.- V. 319.- № 5869.- P. 1523-1536.

194. Govaerts C., Wille H., Prusiner S.B., Cohen F.E. Evidence for assembly of prions with left-handed beta 3-helices into trimers // P Natl Acad Sci USA.- 2004.-V. 101.- № 22.- P. 8342-8357.

195. Prusiner S.B. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie // Science.- 1982.- V. 216.- № 4542.- P. 136-144.

196. Sweeting B., Khan M.Q., Chakrabartty A., Pai E.F. Structural factors underlying the species barrier and susceptibility to infection in prion disease // Biochem Cell Biol.- 2010.- V. 88.- № 2.- P. 195-202.

197. Aguzzi A., Calella A.M. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases// Physiol Rev.- 2009.- V. 89.- № 4.- P. 1105-1152.

198. Kelly J.W. Mechanisms of amyloidogenesis // Nat Struct Biol.- 2000.- V. 7.-№ 10.- P. 824-836.

199. You H.T., Tsutsui S., Hameed S., Kannanayakal T.J., Chen L.N., Xia P., Engbers J.D.T., Lipton S.A., Stys P.K., Zamponi G.W. A beta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors // P Natl Acad Sci USA.- 2012.- V. 109.- № 5.- P. 1737-1742.

200. Stys P.K., You H.T., Zamponi G.W. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders // J Physiol-London.- 2012.- V. 590.- № 6.- P. 1357-1368.

201. Lauren J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers // Nature.- 2009.- V. 457.- № 7233.- P. 1128-U84.

202. Gimbel D.A., Nygaard H.B., Coffey E.E., Gunther E.C., Lauren J., Gimbel Z.A., Strittmatter S.M. Memory Impairment in Transgenic Alzheimer Mice Requires Cellular Prion Protein // J Neurosci.- 2010.- V. 30.- № 18.- P. 6367-6374. 203. Gunther E.C., Strittmatter S.M. beta-amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease // J Mol Med-Jmm.- 2010.- V. 88.- № 4.- P. 331-338.

204. Um J.W., Kaufman A.C., Kostylev M., Heiss J.K., Stagi M., Takahashi H., Kerrisk M.E., Vortmeyer A., Wisniewski T., Koleske A.J., Gunther E.C., Nygaard H.B., Strittmatter S.M. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Coreceptor for Alzheimer A beta Oligomer Bound to Cellular Prion Protein // Neuron.- 2013.- V. 80.- № 2.- P. 531-542.

205. Hard T., Lendel C. Inhibition of Amyloid Formation // J Mol Biol.- 2012.- V. 421.- № 4.- P. 441-465.

206. Kiselev G.G., Naletova I.N., Sheval E.V., Stroylova Y.Y., Schmalhausen E.V., Haertle T., Muronetz V.I. Chaperonins induce an amyloid-like

transformation of ovine prion protein: The fundamental difference in action between eukaryotic TRiC and bacterial GroEL // Bba-Proteins Proteom.- 2011.- V. 1814.- № 12.- P. 1730-1738.

207. Jagota S., Rajadas J. Synthesis of D-amino acid peptides and their effect on beta-amyloid aggregation and toxicity in transgenic Caenorhabditis elegans // Med Chem Res.- 2013.- V. 22.- № 8.- P. 3991-4000.

208. Giamogante F., Marrocco I., Romaniello D., Eufemi M., Chichiarelli S., Altieri F. Comparative Analysis of the Interaction between Different Flavonoids and PDIA3 // Oxid Med Cell Longev.- 2016.- V. 9- P. 386-393.

209. Klajnert B., Cortijo-Arellano M., Cladera J. Pamam dendrimers' influence on the formation and disruption of amyloid fibrils // Febs J.- 2006.- V. 273.- P. 239-245.

210. Klajnert B., Cortijo-Arellano M., Cladera J., Bryszewska M. Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation // Biochem Bioph Res Co.- 2006.- V. 345.- № 1.- P. 21-28.

211. Supattapone S., Wille H., Uyechi L., Safar J., Tremblay P., Szoka F.C., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells // J Virol.- 2001.- V. 75.- № 7.- P. 3453-3461.

212. Heegaard P.M.H., Boas U., Otzen D.E. Dendrimer effects on peptide and protein fibrillation // Macromolecular Bioscience.- 2007.- V. 7.- № 8.- P. 1047-1059.

213. Supattapone S., Nguyen H.O.B., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics // P Natl Acad Sci USA.- 1999.- V. 96.- № 25.- P. 14529-14534.

214. Solassol J., Crozet C., Perrier V., Leclaire J., Beranger F., Caminade A.M., Meunier B., Dormont D., Majoral J.P., Lehmann S. Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie // J Gen Virol.- 2004.- V. 85.- P. 1791-1799.

215. Klajnert B., Cortijo-Arellano M., Cladera J., Majoral J.P., Caminade A.M., Bryszewska M. Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208 // Biochem Bioph Res Co.- 2007.- V. 364.- № 1.- P. 20-35.

216. Jackson K.S., Yeom J., Han Y.M., Bae Y., Ryou C. Preference toward a polylysine enantiomer in inhibiting prions // Amino acids.- 2013.- V. 44.- № 3.- P. 993-1000.

217. Neelov I.M., Janaszewska A., Klajnert B., Bryszewska M., Makova N.Z., Hicks D., Pearson H.A., Vlasov G.P., Ilyash M.Y., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A., Turner A.J., Nalivaeva N.N. Molecular Properties of Lysine Dendrimers and their Interactions with A beta-Peptides and Neuronal Cells // Curr Med Chem.- 2013.- V. 20.- № 1.- P. 134-143.

218. Klajnert B., Appelhans D., Komber H., Morgner N., Schwarz S., Richter S., Brutschy B., Ionov M., Tonkikh A.K., Bryszewska M., Voit B. The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly(propylene imine) dendrimers: New effects dependent on hydrogen bonding // Chem-Eur J.-2008.- V. 14.- № 23.- P. 7030-7041.

219. Fischer M., Appelhans D., Schwarz S., Klajnert B., Bryszewska M., Voit B., Rogers M. Influence of Surface Functionality of Poly(propylene imine) Dendrimers on Protease Resistance and Propagation of the Scrapie Prion Protein // Biomacromolecules.- 2010.- V. 11.- № 5.- P. 1314-1325.

220. Klajnert B., Cortijo-Arellano M., Bryszewska M., Cladera J. Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases // Biochem Bioph Res Co.- 2006.- V. 339.- № 2.- P. 577-582.

221. Wasiak T., Ionov M., Nieznanski K., Nieznanska H., Klementieva O., Granell M., Cladera J., Majoral J.P., Caminade A.M., B. K. Phosphorus dendrimers affect Alzheimer's (Aβ1-28) peptide and MAP-Tau protein aggregation // Molecular pharmacology.- 2012.- V. 9.- № 3.- P. 458-469.

222. Klementieva O., Benseny-Cases N., Gella A., Appelhans D., Voit B., Cladera J. Dense shell glycodendrimers as potential nontoxic anti-amyloidogenic agents in Alzheimer's disease. Amyloid-dendrimer aggregates morphology and cell toxicity // Biomacromolecules.- 2011.- V. 12.- № 11.- P. 3903-3919.

223. Milowska K., Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J.P., Bryszewska M., Gabryelak T. Viologen-Phosphorus Dendrimers Inhibit alpha-Synuclein Fibrillation // Mol Pharmaceut.- 2013.- V. 10.- № 3.- P. 1131-1147.

224. Milowska K., Grochowina J., Katir N., El Kadib A., Majoral J.P., Bryszewska M., Gabryelak T. Interaction between viologen-phosphorus dendrimers and alphasynuclein // J Lumin.- 2013.- V. 134.- P. 132-137.

225. Milowska K., Malachowska M., Gabryelak T. PAMAM G4 dendrimers affect the aggregation of alpha-synuclein // Int J Biol Macromol.- 2011.- V. 48.- № 5.- P. 742-756.

226. Rekas A., Lo V., Gadd G.E., Cappai R., Yun S.L. PAMAM Dendrimers as Potential Agents against Fibrillation of alpha-Synuclein, a Parkinson's Disease-Related Protein // Macromolecular Bioscience.- 2009.- V. 9.- № 3.- P. 230-238.

227. Lane A.R., Stanley C.J., Wilson S.M. Binding of pathological forms of prion protein. 2010.

228. Supattapone S., Nguyen H.O.B., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M. Branched polyamines enhance prion clearance // Neurology.- 2000.- V. 54.- № 7.- P. A412

229. Wasiak T., Ionov M., Nieznanski K., Nieznanska H., Klementieva O., Granell M., Cladera J., Majoral J.P., Caminade A.M., Klajnert B. Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer's (A beta(1-28)) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation // Mol Pharmaceut.- 2012.- V. 9.- № 3.- P. 458-469.

230. Breydo L., Bocharova O.V., Baskakov I.V. Semiautomated cell-free conversion of prion protein: Applications for high-throughput screening of potential antiprion drugs // Anal Biochem.- 2005.- V. 339.- № 1.- P. 165-173.

231. Klajnert B., Cladera J., Bryszewska M. Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence // Biomacromolecules.- 2006.- V. 7.- № 7.- P. 2186-2191.

232. Scherrenberg R., Coussens B., van Vliet P., Edouard G., Brackman J., de Brabander E., Mortensen K. The molecular characteristics of poly(propyleneimine) dendrimers as studied with small-angle neutron scattering, viscosimetry, and molecular dynamics // Macromolecules.- 1998.- V. 31.- № 2.- P. 456-461.

233. Shifrina Z.B., Rajadurai M.S., Firsova N.V., Bronstein L.M., Huang X.L., Rusanov A.L., Muellen K. Poly(phenylene-pyridyl) dendrimers: Synthesis and templating of metal nanoparticles // Macromolecules.- 2005.- V. 38.- № 24.- P. 9920-9932.

234 Kuchkina N.V., Yuzik-Klimova E.Y., Sorokina S.A., Peregudov A.S., Antonov D.Y., Gage S.H., Boris B.S., Nikoshvili L.Z., Sulman E.M., Morgan D.G., Mahmoud W.E., Al-Ghamdi A.A., Bronstein L.M., Shifrina Z.B. Polyphenylenepyridyl Dendrons with Functional Periphery and Focal Points: Syntheses and Applications // Macromolecules.- 2013.- V. 46.- № 15.- P. 5890-5898.

235. <u>http://www.materials-talks.com/blog/2017/01/23/intensity-volume-number-</u>which-size-is-correct/.

236. Shtykoya E.V., Kuchkina N.V., Shifrina Z.B., Bronstein L.M., Svergun D.I. Unusual Structural Morphology of Dendrimer/CdS Nanocomposites Revealed by Synchrotron X-ray Scattering // J Phys Chem C.- 2012.- V. 116.- № 14.- P. 8069-8078.

237. Sorokina S., Semenyuk P., Stroylova Y., Muronetz V., Shifrina Z. Complexes between cationic pyridylphenylene dendrimers and ovine prion protein: do hydrophobic interactions matter? // Rsc Adv.- 2017.- V. 7.- № 27.- P. 16565-16574.

238. G.A. D. Quenching of aromatic hydrocarbons by alkylpyridinium halides // JCS Chem Commun.- 1973.- V.12 - P. 728-739.

239. Shinitzsky M., Rivnay B. Degree of exposure of membrane proteins by fluorescence quenching // Biochemistry-Us.- 1977.- V. 16.- № 5.- P. 982–996.

240. Eftink M.R. Fluorescence techniques for studying protein structure // Methods of biochemical analysis.- 1991.- V. 35.- P. 127-205.

241. Burstein E.A., Abornev S.M., Reshetnyak Y.K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms // Biophys J.- 2001.- V. 81.- № 3.- P. 1699-1709.

242. Reshetnyak Y.K., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // Biophys J.- 2001.- V. 81.- № 3.- P. 1710-1734.

243. Sorokina S., Stroylova Y., Semenyuk P., Shifrina Z., Muronetz V. Pyridylphenylene dendrimers influence the amyloid transformation of prion protein // Febs Open Bio.- 2018.- V. 8.- P. 408.

244. Wang L., Maji S.K., Sawaya M.R., Eisenberg D., Riek R. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure // Plos Biol.- 2008.- V. 6.- № 8.- P. 1791-1801.

245. Wasmer C., Benkemoun L., Sabate R., Steinmetz M.O., Coulary-Salin B., Wang L., Riek R., Saupe S.J., Meier B.H. Solid-State NMR Spectroscopy Reveals that E. coli Inclusion Bodies of HET-s(218-289) are Amyloids // Angew Chem Int Edit.- 2009.- V. 48.- № 26.- P. 4858-4869.

246. Sorokina S.A., Stroylova Y.Y., Shifrina Z.B., Muronetz V.I. Disruption of amyloid prion protein aggregates by cationic pyridylphenylene dendrimers // Macromolecular Bioscience.- 2016.- V. 16.- № 2.- P. 266-275.

247. Shifrina Z.B., Kuchkina N.V., Rutkevich P.N., Vlasik T.N., Sushko A.D., Izumrudov V.A. Water-Soluble Cationic Aromatic Dendrimers and Their Complexation with DNA // Macromolecules.- 2009.- V. 42.- № 24.- P. 9548-9560.

248. Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hoa G.H.B., Haertle T., Grosclaude J., Debey P. High yield purification and physico-chemical properties of

full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility // Eur J Biochem.- 2000.- V. 267.- № 10.- P. 2833-2839.

249. Воеводин В.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. Практика суперкомпьютера "Ломоносов" // Открытые системы.- 2012.- V. 7. - Р. 36-39.