

Можно заметить, что DMASEBT аналогично ThT имеет две моды связывания с фибриллами на основе инсулина (что подтверждается нелинейностью зависимости Скетчарда (рис. 2, *д*)) и высокую аффинность к этим амилоидным фибриллам. Кроме того, инкорпорирование аналога в амилоидные фибриллы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения красителя (рис. 2, *в*), а также существенным возрастанием квантового выхода флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния красителя (см. таблицу).

Таким образом, результаты исследования взаимодействия DMASEBT с амилоидными фибриллами на основе инсулина свидетельствуют о том, что синтезированный краситель обладает преимуществами ThT (стабильностью в широком диапазоне pH раствора, специфичностью взаимодействия с фибриллами и изменением фотопизических характеристик при взаимодействии с ними). При этом он имеет спектральные характеристики, существенно сдвинутые относительно характеристик ThT в длинноволновую область (примерно на 100 нм). В связи с этим сделано заключение о перспективности использования зонда DMASEBT для детекции амилоидных фибрилл. Полученные результаты могут быть востребованы при разработке флуоресцентных зондов для диагностики возникновения амилоидных фибрилл в области «окна прозрачности» биологических тканей *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01614) и стипендии Президента РФ (СП-841.2018.4).

Список литературы

De Ferrari G. V., Mallender W. D., Inestrosa N. C., Rosenberry T. L. 2001. Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholi-

nesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. *J. Biol. Chem.* 276 : 23 282—23 287.

Fonin A. V., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PLoS ONE.* 9 : e103878.

Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2016. High fluorescence anisotropy of thioflavin T in aqueous solution resulting from its molecular rotor nature. *Anal. Chem.* 88 : 718—724.

Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2012. A new trend in the experimental methodology for the analysis of the thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Mol. Neurobiol.* 45 : 488—498.

Lavysh A. V., Sulatskaya A. I., Lugovskii A. A., Voropay E. S., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Maskevich A. A. 2014. Photophysical properties of trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate, a new structural analog of thioflavin T. *J. Appl. Spectr.* 81 : 205—213.

LeVine H., 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2 : 404—410.

LeVine H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Meth. Enzymol.* 309 : 274—284.

Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177 : 244—249.

Rovnyagina N. R., Sluchanko N. N., Tikhonova T. N., Fadeev V. V., Litskevich A. Y., Maskevich A. A., Shirshin E. A. 2018. Binding of thioflavin T by albumins: an underestimated role of protein oligomeric heterogeneity. *Int. J. Biol. Macromol.* 108 : 284—290.

Sulatskaya A. I., Lavysh A. V., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2017. Thioflavin T fluorescence as excimer in highly concentrated aqueous solutions and as monomer being incorporated in amyloid fibrils. *Sci. Rep.* 7 : 2146.

Поступила 16 VII 2018

PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF A NEW THIOFLAVIN T ANALOGUE, FLUORESCENT DYE DMASEBT, IN WATER SOLUTIONS AND BOUND TO AMYLOID FIBRILS

A. I. Sulatskaya,^{1,} O. I. Povarova,¹ M. I. Sulatsky,¹ N. P. Rodina,¹ I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov^{1,2}*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: ansul@mail.ru

The photophysical properties of a new analogue of the fluorescent probe thioflavin T (ThT), trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate (DMASEBT), were investigated. A confirmation of the dye stability in a wide range of the solution pH was obtained, including, under the conditions of the tested amyloid fibrils preparation. Using a specially developed approach based on the spectroscopic study of samples prepared by the equilibrium microdialysis, it was shown that incorporation of DMASEBT into insulin amyloid fibrils results in a long-wave shift of its absorption spectrum, as well as a significant increase in the dye fluorescence quantum yield and lifetime. In addition, it was shown that the binding constants of ThT and DMASEBT to insulin amyloid fibrils based are of the same order. Based on the obtained results, it was concluded that DMASEBT has the properties of the molecular rotor (what is the key point for the fluorescent probe), has a similar to ThT mechanism of interaction with amyloid fibrils and the improved spectral properties compared to ThT shifted to the «transparency window» of the biological tissues. Thus, it has been shown that DMASEBT is a perspective diagnostic agent for the study of amyloid fibrils.

Key words: amyloid fibrils, fluorescent probes, thioflavin T (ThT), trans-2-[4-(dimethylamino)styryl]-3-ethyl-1,3-benzothiazolium perchlorate (DMASEBT), photophysical properties, binding parameters