

# НОВЫЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АМИЛОИДА

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.11  
УДК 547.458.8:616.62–003.821  
Поступила 7.12.2015 г.



**С.П. Сапожников**, д.м.н., зав. кафедрой медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии<sup>1</sup>;  
**П.Б. Карышев**, лаборант кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии<sup>1</sup>;  
**А.И. Шептухина**, аспирант медицинского факультета<sup>1</sup>;  
**О.В. Николаева**, ординатор медицинского факультета<sup>1</sup>;  
**А.А. Авруйская**, аспирант кафедры биологии и химии<sup>2</sup>;  
**Ю.Н. Митрасов**, д.х.н., профессор кафедры биологии и химии<sup>2</sup>;  
**В.А. Козлов**, д.б.н., к.м.н., профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, 428015, Московский проспект, 15;

<sup>2</sup>Чувашский государственный педагогический университет им. И.Я. Яковлева, Чебоксары, 428000, ул. Карла Маркса, 38

На основе представлений о супрамолекулярном неферментативном взаимодействии амилоида с известными флюоресцентными зондами (тиофлавин Т и конго красный) осуществлен поиск веществ, перспективных в качестве флюоресцентных зондов, селективных к амилоиду в ряду производных 4-N-арил-3,5-диоксо-1-формил-10-окса-4-азатрицикло [5.2.11.7.02.6]дец-8-енов.

Сухие кристаллы выбранных веществ, имеющих подобное тиофлавинову Т строение молекулярного ротора, при возбуждении ультрафиолетом излучали в видимом диапазоне 421,0–435,5 нм. Растворение веществ в 96° этаноле гасит свечение. Водно-спиртовые растворы этих веществ (0,75%; вода:этанол 96°=1:1; pH>7) также практически не излучали (за пределами чувствительности ФЭУ-39). Обработка обезличенных депарафинированных, предварительно окрашенных гематоксилином срезов почки человека с клинически и гистологически доказанным амилоидозом почки спиртовыми растворами исследуемых препаратов не сопровождалась выраженным свечением. Окраска срезов той же почки водно-спиртовыми ошелоченными растворами этих препаратов после заделки в нефлюоресцирующую прозрачную среду сопровождалась выраженным свечением в видимом диапазоне на длине волны 534 нм всех структур почки, с более интенсивным свечением амилоидных депозитов, чем клеточных структур.

**Заключение.** Полученный результат открывает хорошие перспективы использования исследованных веществ в качестве новых флюорофоров для выявления амилоида.

**Ключевые слова:** амилоид; флюоресцентные зонды; молекулярные моторы; амилоидное поражение почки; тиофлавин; дец-ены.

**Как цитировать:** Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Sheptukhina A.I., Nikolayeva O.V., Avruyskaya A.A., Mitrasov Y.N., Kozlov V.A. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 91–98, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.11>

English

## Novel Fluorescent Probes for Amyloid Detection

**S.P. Sapozhnikov**, MD, DSc, Head of the Department of Medical Biology with the Course of Microbiology and Virology<sup>1</sup>;

**P.B. Karyshev**, Laboratory Assistant, Department of Medical Biology with the Course of Microbiology and Virology<sup>1</sup>;

**A.I. Sheptukhina**, PhD Student, Faculty of General Medicine<sup>1</sup>;

**O.V. Nikolayeva**, Resident, Faculty of General Medicine<sup>1</sup>;

**A.A. Avruyskaya**, PhD Student, Department of Biology and Chemistry<sup>2</sup>;

**Y.N. Mitrasov**, DSc, Professor, Department of Biology and Chemistry<sup>2</sup>;

**V.A. Kozlov**, MD, PhD, DSc, Professor, Department of Medical Biology with the Course of Microbiology and Virology<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.N. Ulianov Chuvash State University, 15 Moskovsky Prospect, Cheboksary, 428015, Russian Federation;

<sup>2</sup>I.Y. Yakovlev Chuvash State Pedagogical University, 38 Karl Marx St., Cheboksary, 428000, Russian Federation

**Для контактов:** Козлов Вадим Авенирович, e-mail: pooh12@yandex.ru

Based on the notions of supramolecular nonenzymatic interaction of amyloid with known fluorescent probes (thioflavin T and Congo red) a search for the substances, which may be perspective as fluorescent probes selective to amyloid in the line of 4-N-aryl-3,5-dioxo-1-formyl-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.11.7.02.6]des-8-ene derivatives has been undertaken.

Dry crystals of the chosen substances having the structure of the molecular rotor similar to thioflavin T emitted light in the visible range of 421.0–435.5 nm, when excited by ultraviolet. Dissolution of the substances in 96° ethanol extinguishes fluorescence. Water-alcohol solutions of these substances (0.75%; water:ethanol 96°=1:1, pH>7) also did not emitted the light (beyond the sensitivity of photomultiplier FEU-39). Treating with alcohol solutions of the tested preparations the depersonalized deparaffinated, preliminarily stained with hematoxylin, human kidney sections with clinically and histologically proved kidney amyloidosis was not accompanied by a marked fluorescence. Staining of the sections of the same kidney with water-alcohol alkalized solution of these preparations after imbedding into the non-fluorescent transparent medium was accompanied by luminescence of all kidney structures in the visible range at a wavelength of 534 nm with a more intensive luminescence of amyloid deposits than cellular structures.

**Conclusion.** The result obtained opens good perspectives of using the tested substances as novel fluorophores for detecting amyloid.

**Key words:** amyloid; fluorescent probes; molecular rotors; amyloid kidney damage; thioflavin; azatricyclo-dec-ene.

Сформировавшиеся благодаря работам Жана Мари Лена представления о том, что крупные органические молекулы могут взаимодействовать между собой как макрообъекты без образования сильных химических связей, образуя при этом фактически новое вещество — супрамолекулярную структуру, послужили основой для формирования нового суждения о строении и взаимодействии органических соединений. Один из относительно недавно обнаруженных видов супрамолекулярного взаимодействия заключается в том, что части молекул некоторых органических веществ небелковой природы могут совершать направленное вращение друг относительно друга в результате нарушения  $\pi$ -сопряженных связей внутри молекулы под воздействием внешней энергии [1], что получило название «молекулярный ротор». Такое поведение молекул оставалось бы просто молекулярным курьезом, если бы не свойство роторов при торможении вращении средовым молекулярным окружением переизлучать накопленную потенциальную энергию в видимом световом диапазоне. При этом встраивание молекулярного мотора, если он сам по себе является флюорофором, в какую-либо супрамолекулярную структуру сопровождается батохромным смещением. То есть спектр излучения вещества смещается в красную сторону, что является доказательством встраивания. Это свойство позволяет идентифицировать среду, с которой специфично связывается такой флюорофор: есть связывание — есть свечение, нет связывания — нет свечения. Справедливо противоположное утверждение: если какое-то вещество, связываясь с такой средой, начинает флюоресцировать более интенсивно, чем без связывания, и наблюдается батохромный эффект, то оно является молекулярным ротором.

В качестве одного из таких веществ выступает специфичный флюоресцентный лиганд амилоида — тиофлавин. Как полагают, низкий квантовый выход индуцированного ультрафиолетом свечения тиофлавина в маловязких средах обусловлен вращательным движением бензотиазольного и *N,N*-диметиламинового колец друг относительно друга. При встраивании

тиофлавина в структуру амилоида происходит значительное увеличение квантового выхода [1, 2]. В процессе изучения взаимодействия тиофлавина с амилоидом было установлено, что он служит селективным разрушителем амилоида, по крайней мере *in vitro* [3]. В связи с этим в ряду производных тиофлавина был начат поиск веществ, перспективных для использования в качестве средства диагностики амилоидоза [4], а также в качестве лекарственных средств для лечения амилоидозов [5], поскольку эффективных методов своевременной диагностики, профилактики и терапии этого заболевания до настоящего времени не разработано. Более того, не выявлено предикторов, позволяющих выделить группы больных, у которых течение основного заболевания осложнится развитием амилоидоза.

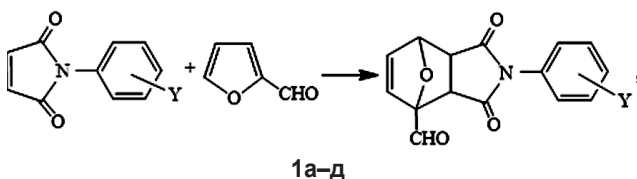
Тиофлавин не производится в Российской Федерации и закупается за рубежом. В соответствии с технологическим паспортом, предоставляемым вместе с препаратом фирмой-производителем (Santa Cruz Biotechnology, США), ЛД<sub>50</sub> тиофлавина при пероральном приеме у мышей составляет 151 мг/кг массы. В соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 и СанПиН 2.1.4.1074-01 он относится к третьему классу токсичности — умеренно опасным веществам (диапазон 151–5000 мг/кг массы). С учетом разброса вариационного ряда этот препарат может попадать во второй класс токсичности, что исключает возможность его медицинского применения. Данный вывод был подтвержден нами в предварительных исследованиях токсичности тиофлавина [6], в которых подкожное введение мышам препарата в дозе 50 мг/кг сопровождалось 100% летальностью. По этой причине и в связи с малым количеством дорогостоящего реактива было принято решение использовать его только как постмортальный краситель без уточнения токсичности при парентеральном введении. Поскольку антиамилоидный эффект тиофлавина, как предполагается, обусловлен супрамолекулярным взаимодействием с амилоидом [3], его фармакологическая эффективность должна находиться в прямой количественной

зависимости от вводимой дозы. По этой причине использование тиофлавина или его близких производных в качестве лекарственных средств кажется бесперспективным.

Тем не менее можно предположить существование веществ, близких по химической структуре к тиофлавину, не являющихся бензотиазольными производными, однако имеющих аналогичные свойства молекулярных моторов, которые можно использовать в качестве флюорофоров для выявления амилоида.

**Цель исследования** — поиск флюорофорных меток, селективных к амилоиду, среди веществ, имеющих химическую структуру, близкую к тиофлавину.

**Материалы и методы.** Сотрудниками кафедры биологии и химии ЧГПУ им. И.Я. Яковлева и медицинского факультета ЧГУ им. И.Н. Ульянова был осуществлен дизайн молекулы молекулярного ротора на основе структуры азатрициклодецена, завершившийся синтезом производных 4-N-арил-3,5-диоксо-1-формил-10-окса-4-азатрицикло[5.2.11.7.02.6]дец-8-енов (формула 1а–д), для использования в качестве перспективных флюоресцентных зондов, селективных к амилоиду:



где Y=2 — NO<sub>2</sub> (а), 3 — NO<sub>2</sub> (б), 4 — NO<sub>2</sub> (в), 3 — COOH (г), 4 — COOH (д).

Синтез исследуемых веществ (1а–д) осуществлялся взаимодействием легкодоступных N-арил-2,5-дигидропиррол-2,5-дионов с фуран-2-карбальдегидом при эквимолярном соотношении реагентов при комнатной температуре [6, 7]. В качестве растворителя использовали абсолютный 1,4-диоксан. Чистоту синтезированных продуктов контролировали по данным тонкослойной хроматографии, а структуру подтверждали методами ИК-, ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии. Соединения (1а–д) представляют собой кристаллические вещества светло-желтого или оранжевого цвета, константы и данные элементного анализа которых приведены в табл. 1.

Эксперименты с окрашиванием амилоидных депозитов проведены на обезличенных 5 мкм парафиновых срезах почек человека, предоставленных Республиканским бюро судебно-медицинской экспертизы (Чебоксары, Россия), где клинически установленный диагноз амилоидоза был подтвержден патогистологически. Три серии депарафинированных срезов были предварительно окрашены гематоксилином. Контрольная (первая) серия была окрашена тиофлавином Т по Вассару [8].

Вторая серия срезов после окраски гема-

токсилином была в течение 3 мин дополнительно обработана спиртовыми растворами исследуемых препаратов 1а–д, третья серия — водно-спиртовыми. Спиртовые 1,5% растворы приготавливали путем растворения навески препаратов при комнатной температуре в 96° спирте, водно-спиртовые — путем разбавления полученного спиртового раствора 1% водным раствором NaOH 1:1 по объему (рН>7), финальная концентрация препаратов составляла 0,75%. После окрашивания срезы были промыты водой, обезвожены и заделаны в полистирол.

Микроскопию срезов проводили на микроскопе «Люмам-4» («Ломо», Россия). Флюориметрию осуществляли с помощью микролюминиметра ФМЭЛ-1А («Ломо», Россия), запирающий светофильтр ЖС18, I<sub>возб.</sub>=410 нм, светофильтры ФС, БС, СЗС. Электрические параметры на всех замерах были одинаковыми: входное напряжение — 900 В, сопротивление усилителя — 10<sup>6</sup> Ом. В насадке был установлен зонд 0,5. Для измерения использовали ФЭУ-39, показания снимали с цифрового вольтметра, данные представлены в милливольтгах (мВ). Микрофотографии получены с помощью цифровой камеры Levenhuk С800 NG 8М (Levenhuk, США).

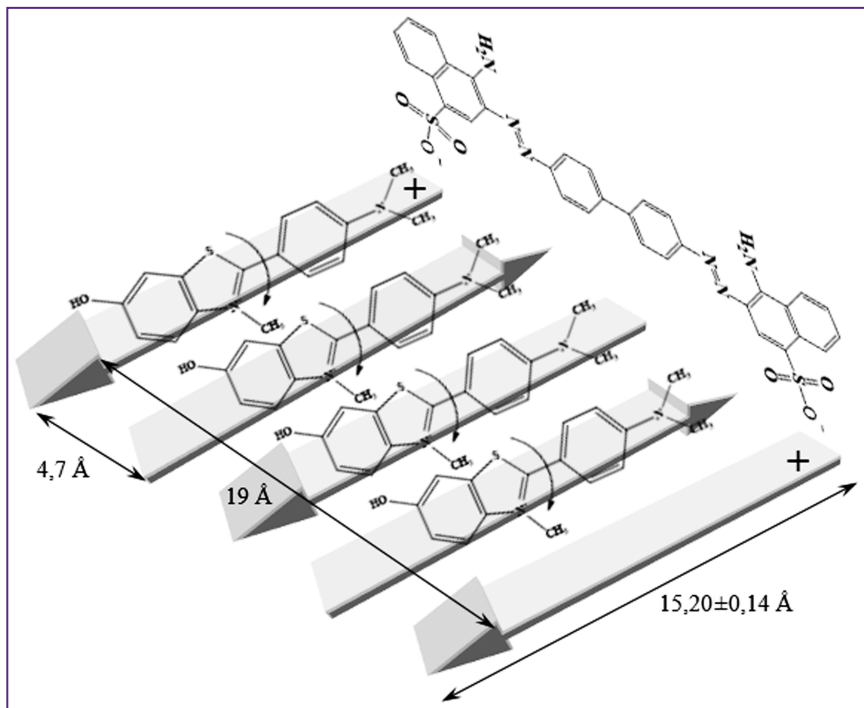
**Результаты и обсуждение.** В соответствии с современными представлениями, амилоид представляет собой нанотрубку, образующуюся в результате агрегации короткоцепочечных (38–42 аминокислотных остатка) мономерных фрагментов, осуществивших дисфолдинг в β-складчатую конформацию. Образование β-листа в данном частном случае имеет энергетический выигрыв, поскольку физиологическая конформация пептида — предшественника амилоида — метастабильна, т.е. имеет некоторый избыток максимума энергии. Сброс избыточной энергии осуществляется в результате самоукладки в β-лист, конформация которого отвечает условию минимума энергии при данных химических условиях среды и потому стабильна [9, 10] (рис. 1).

В результате взаимопараллельной укладки нитей из 38–42 аминокислотных остатков создается регу-

Т а б л и ц а 1

**Выходы, константы и данные элементного анализа**

Номер соединения	Выход, %	Температура плавления, °С	Найдено, %			Брутто-формула
			Вычислено, %			
			С	Н	N	
1а Y=2 — NO <sub>2</sub>	62	95–98	57,32	3,18	8,91	C15H10N2O6
			57,40	3,24	9,01	
1б Y=3 — NO <sub>2</sub>	40	201–203	57,32	3,18	8,91	C15H10N2O6
			57,42	3,27	9,02	
1в Y=4 — NO <sub>2</sub>	51	189–191	57,32	3,18	8,91	C15H10N2O6
			57,43	3,26	8,99	
1г Y=3 — COOH	50	215–217	61,34	3,51	4,47	C16H11NO6
			61,45	3,63	4,59	
1д Y=4 — COOH	54	223–225	61,34	3,51	4,47	C16H11NO6
			61,45	3,59	4,55	



**Рис. 1. Модель связывания конго красного [11] и тиюфлавина Т [12] с амилоидными фибриллами:**

амилоид сворачивается в  $\beta$ -складчатый лист, при этом каждая пятая цепочка белка имеет одинаковое N–C-направление. Длина молекулы конго красного составляет  $\approx 19 \text{ \AA}$ , поэтому ее отрицательно заряженные сульфатные группы связываются с положительно заряженными остатками аминокислот в первой и пятой полипептидных цепях  $\beta$ -складчатого листа амилоида. Следующая молекула красителя связывается с третьей и седьмой цепочками и т.д. [11]. В молекуле тиюфлавина, имеющей линейные размеры: длина —  $15,2 \pm 0,14 \text{ \AA}$ , ширина бензотиазольной части —  $6,1 \pm 0,1 \text{ \AA}$ , диметилзамещенной анилиновой части —  $4,3 \pm 0,1 \text{ \AA}$ , в жидкой среде происходит вращение анилинового кольца относительно бензотиазольного. Вращение осуществляется за счет тепловой энергии внешней среды. Встраивание молекулы тиюфлавина в бороздки  $\beta$ -листа амилоида возможно вследствие идеальной комплементарности этих молекулярных структур. Заклинивание молекулы тиюфлавина в бороздке  $\beta$ -листа прекращает вращение частей этой молекулы друг относительно друга, но не накопление внешней энергии в  $\pi$ -сопряженных связях. Поскольку возможность преобразования накопленной энергии в механическое вращение в образованной супрамолекуле невозможна, происходит ее переизлучение в видимом диапазоне. Данная модель объясняет специфичность взаимодействия конго красного и тиюфлавина Т с амилоидными фибриллами и демонстрирует различия связывания этих красителей с амилоидом

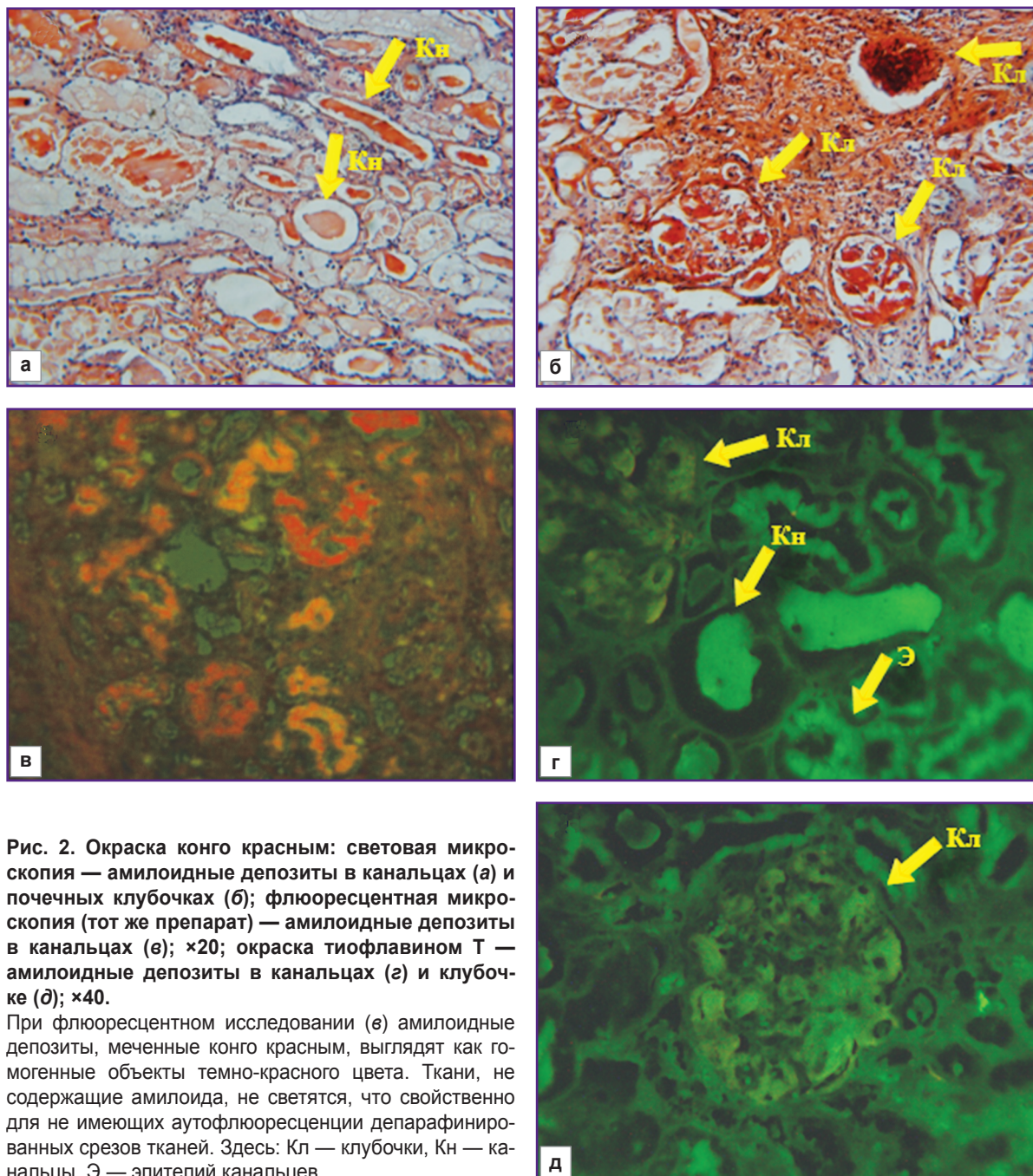
лярная структура — нанотрубка диаметром 10–20 нм и длиной до 1000 нм [13], способная к супрамолекулярным взаимодействиям. Она находится в состоянии энергетического минимума и более устойчива к действию пептидаз, чем исходный белок. По этой причине амилоид накапливается в тканях. При классической окраске амилоидных депозитов в тканях конго красным методом световой микроскопии амилоид обнаруживается в виде кирпично-красных образований как в цитоплазме некоторых клеток, так и в межклеточном пространстве (рис. 2, а, б).

Конго красный способен к индуцированной ультра-

фиолетом красной флюоресценции в видимом диапазоне (рис. 2, в). Однако квантовый выход этой флюоресценции настолько низок, что она представляет только теоретический интерес и не нашла широкого практического применения. Установлено, что конго красный встраивается только в торцы амилоидных  $\beta$ -листов (см. рис. 1). Поскольку амилоид представляет собой агрегаты таких  $\beta$ -листов, образующих нанотрубочки, которые связываются с полисахаридами соединительной ткани, трудно ожидать, что конго красный будет взаимодействовать со всеми местами специфического связывания. Следовательно, трудно ожидать наличия параметрических характеристик такого связывания в ткани. Тем не менее окраска конго красным как достаточно простой и высокоспецифичный метод окрашивания амилоида продолжает оставаться клинически важным эталоном сравнения, позволяющим верифицировать специфичность других методов окраски амилоида.

Второй, редко используемый в Российской Федерации, но высокоспецифичный метод выявления амилоида — флюоресценция с тиюфлавинами Т или S (рис. 2, г, д). При окрашивании этим красителем амилоид выглядит как зелено-коричневые флюоресцирующие объекты. На препаратах почки амилоидные депозиты в просвете канальцев и амилоид цитоплазмы эпителия канальцев выглядят как ярко-зеленые, практически однородные объекты. В стенках сосудов и между капиллярными петлями почечных клубочков амилоид светится менее интенсивно-коричневым оттенком. Участки тканей, не содержащие амилоид, выглядят темно-зелеными, практически черными. Клеточные ядра дифференцируются как округлые несветящиеся объекты.

Встраивание тиюфлавина в структуру  $\beta$ -листа амилоида отличается от взаимодействия с амилоидом конго красного (см. рис. 1). Если конго встраивается в торец  $\beta$ -листа, то тиюфлавин, возможно, укладывается в складки  $\beta$ -листа (стрелки на рис. 1), что прекращает вращение его диметиламинобензольного кольца относительно бензотиазольного. Максимум



**Рис. 2.** Окраска конго красным: световая микроскопия — амилоидные депозиты в канальцах (а) и почечных клубочках (б); флуоресцентная микроскопия (тот же препарат) — амилоидные депозиты в канальцах (в);  $\times 20$ ; окраска тиофлавином Т — амилоидные депозиты в канальцах (г) и клубочке (д);  $\times 40$ .

При флуоресцентном исследовании (в) амилоидные депозиты, меченные конго красным, выглядят как однородные объекты темно-красного цвета. Ткани, не содержащие амилоида, не светятся, что свойственно для не имеющих аутофлуоресценции депарафинированных срезов тканей. Здесь: Кл — клубочки, Кн — канальцы, Э — эпителий канальцев

флуоресценции тиофлавина приходится на 534 нм. Интенсивность свечения intactных тканей составляет  $0,014 \pm 0,003$  мВ, пораженных амилоидом клубочков —  $0,046 \pm 0,015$  мВ, эпителия канальцев —  $0,053 \pm 0,012$  мВ, амилоидных депозитов в просвете канальцев —  $0,72 \pm 0,20$  мВ. Высокий размах вариационного ряда свидетельствует о том, что интенсивность флуоресценции амилоида, меченного тиофлавином, значительно различается в разных участках ткани почки, а это в свою очередь может свидетельствовать о наличии концентрационной зависимости. Сравнение структуры синтезированных нами соединений 1а–д и тиофлавина Т (см. рис. 1) показывает, что они близки.

Если в тиофлавине функцию «якоря» выполняет метильная группа при азоте бензотиазольного кольца, то в наших соединениях — метилальдегидная группа.

У исследованных препаратов 1а–д в сухом кристаллическом виде максимум флуоресценции отмечался в диапазоне 421,0–436,5 нм (рис. 3).

Ни спиртовой, ни водно-спиртовой растворы этих веществ в диапазоне концентраций от 0,75 до 1,5% регистрируемой флуоресценции с помощью ФЭУ-39 не обнаруживали. После обработки срезов амилоидной почки препаратами 1а–д наблюдается интенсивная флуоресценция с максимумом в области 534 нм, т.е. связывание этих веществ с амилоидными depo-

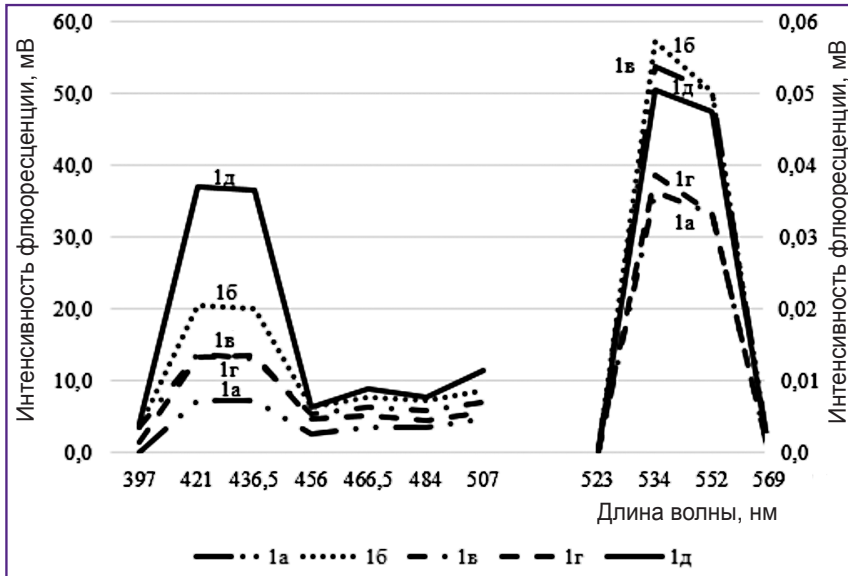


Рис. 3. Сопоставление флюоресценции сухих кристаллов исследуемых флюорофоров (левая шкала) и связанных с амилоидом на препаратах почки (правая шкала). Наблюдается выраженный батохромный сдвиг флюоресценции при связывании с амилоидом

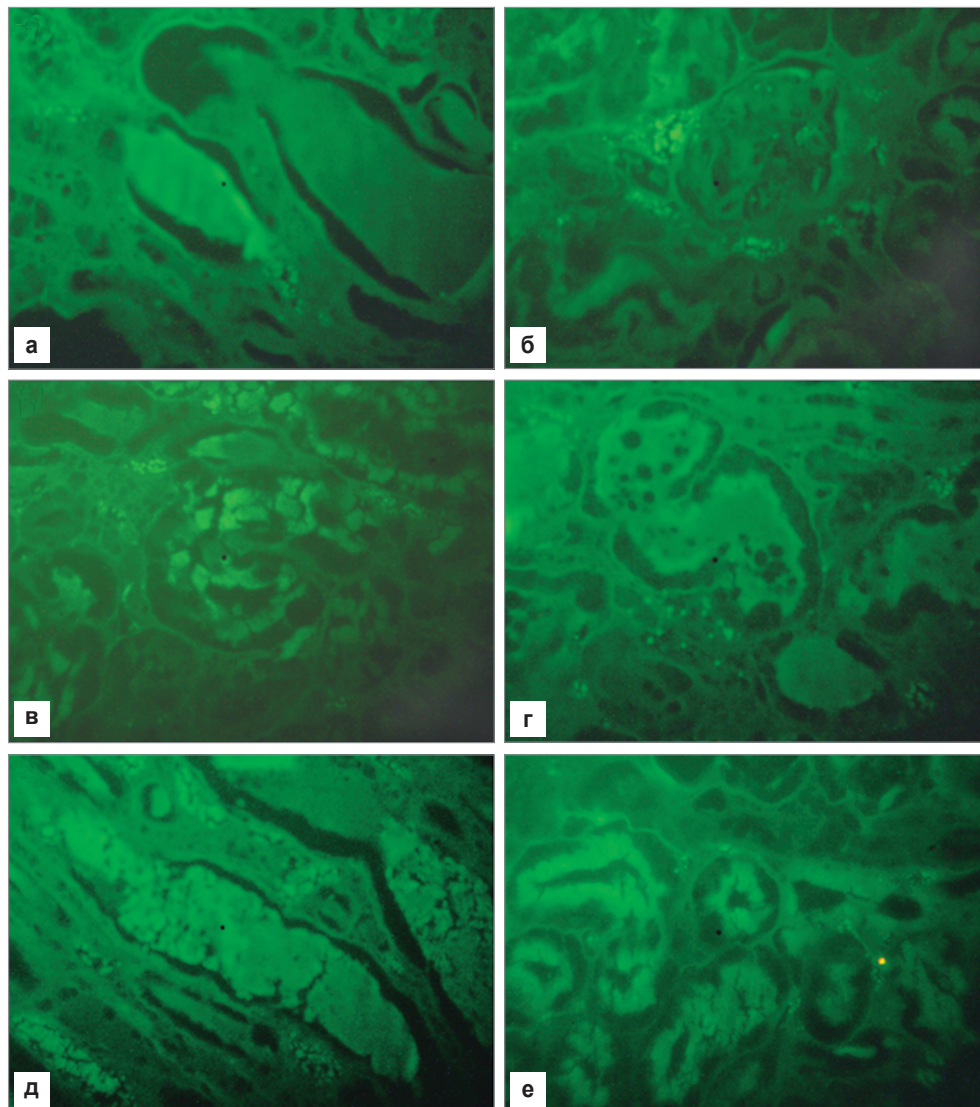


Рис. 4. Результаты окрашивания парафиновых срезов амилоидной почки препаратами (1а–д),  $\times 40$ : препарат 1а — амилоидные депозиты в канальцах (а) и клубочках (б); препараты 1б (в), 1в (г), 1г (д) — амилоидные депозиты в клубочках; препарат 1д — амилоидные депозиты в канальцах (д, е)

Таблица 2

## Интенсивность флюоресценции исследуемых препаратов 1а–д, мВ

Объект	Препараты				
	1а	1б	1в	1г	1д
Клубочки	0,028±0,003	0,038±0,004	0,044±0,014	0,029±0,004	0,041±0,009
Депозиты	0,038±0,006	0,065±0,020	0,057±0,004	0,037±0,016	0,051±0,013
Эпителий канальцев	0,044±0,015	0,068±0,008	0,060±0,006	0,047±0,007	0,060±0,010

зитами сопровождается выраженным батохромным сдвигом (рис. 4).

Меньшее по интенсивности свечение обнаруживалось в клубочках с хорошо выявляемым париетальным листком капсулы и темно-зелеными депозитами амилоида, расположенными между петель клубочка, эпителием канальцев и эндотелием артериол. Обнаруживаемое свечение равномерно располагалось в цитоплазме клеток. Клеточные ядра выглядели как темные нефлюоресцирующие овальные объекты.

Интенсивность флюоресценции исследуемых препаратов в структурах почки (табл. 2) значительно не различается, что объясняется близостью их химического строения.

Все препараты 1а–д предположительно должны иметь низкую токсичность, поскольку ранее проведенное исследование острой токсичности азатрициклодецинов [6] позволило отнести эту группу соединений к четвертому классу токсичности.

**Заключение.** Исследованные препараты 1а–д, растворенные в водно-спиртовой среде, при pH>7, проявляют свойства селективных к амилоиду флюорофоров. Связывание препаратов 1а–д с амилоидными депозитами сопровождается резким увеличением интенсивности флюоресценции по сравнению с их водно-спиртовыми растворами и выраженным батохромным сдвигом. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что механизм реализации флюоресцентных свойств новых изученных веществ реализуется аналогично тиофлавины Т. Учитывая дешевизну исходных веществ, необходимых для синтеза препаратов 1а–д, простоту и дешевизну самого синтеза, высокий квантовый выход, простоту окрашивания препаратов, а также вероятную низкую токсичность, можно утверждать, что все предлагаемые вещества имеют хорошую перспективу использования в качестве новых флюорофоров для выявления амилоида.

**Финансирование исследования.** Работа поддержана грантом Фонда содействия развитию малых форм предприятий, договор 0004043.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Сулацкая А.И. Взаимодействие тиофлавина Т с амилоидными фибриллами: механизм встраивания, параметры связывания, изменение фотофизических характеристик

красителя. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб; 2013. Sulatskaya A.I. *Vzaimodeystvie tioflavina T s amiloidnymi fibrillami: mekhanizm vstraivaniya, parametry svyazyvaniya, izmenenie fotofizicheskikh kharakteristik krasitelya*. Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk [Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: mechanism of incorporation, parameters of binding, alteration of photochemical characteristics of the stain. DSc Thesis]. Saint Petersburg; 2013.

2. Кузнецова И.М. Механизмы возникновения и свойства промежуточных, неправильно свернутых и агрегированных форм белков. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб; 2006. Kuznetsova I.M. *Mekhanizmy vznikhoveniya i svoystva promezhutochnykh, nepravil'no svernutykh i agregirovannykh form belkov*. Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk [Mechanisms of formation and properties of intermediate, misfolded, and aggregated forms of proteins. DSc Thesis]. Saint Petersburg; 2006.

3. Liu R., Su R., Qi W., He Z. Photo-induced inhibition of insulin amyloid fibrillation on online laser measurement. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409(2): 229–234, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.132>.

4. Ван Я., Кланк У.Э., Матис Ч.Э. мл. Производные тиофлавина, связывающие амилоид, способ обнаружения in vivo отложений амилоида и способ распознавания болезни Альцгеймера. Патент РФ 2324686 С2. 2008. Van J., Klank U.Eh., Matis Ch.Eh. ml. *Proizvodnye tioflavina, svyazyvayushchie amiloid, sposob obnaruzheniya in vivo otlozheniy amiloida i sposob raspoznavaniya bolezni Al'tsgeymera* [Amyloid-binding thioflavin derivatives, method of in vivo detection of amyloid deposit and method of diagnosis of Alzheimer's disease]. Patent RU 2324686 C2. 2008.

5. Фрештль В., Сринивасачари Н., Ломанн С., Лопес-Дебер М.-П., Мус А., Пильгрэн-Босх М. Новые соединения для лечения заболеваний, связанных с амилоидом или амилоидподобными белками. Патент РФ 2469026 С2. 2012. Freshtl' V., Srinivasachari N., Lomann S., Lopes-Deber M.-P., Mus A., Pil'gren-Bosh M. *Novye soedineniya dlya lecheniya zabolevaniy, svyazannykh s amiloidom ili amiloidpodobnymi belkami* [New compounds for treating amyloid or amyloid-like protein associated diseases]. Patent RU 2469026 C2. 2012.

6. Козлов В.А., Митрасов Ю.Н., Кондратьева О.В., Гордеева И.В., Полякова О.Б., Груздев С.Е., Федорова М.Л., Борзова А.А. Острая токсичность 4-аза-1-гидроксиметил-10-окса-3,5-диоксо-4-фенилтрицикло[5,2,11,7,02,6]дец-8-ена. В кн.: Материалы 8-й международной научной школы «Наука и инновации — 2013». Йошкар-Ола; 2013; с. 264–265. Kozlov V.A., Mitrasov Yu.N., Kondrat'eva O.V., Gordeeva I.V., Polyakova O.B., Gruzdev S.E., Fedorova M.L., Borzova A.A. *Ostraya toksichnost' 4-aza-1-gidroksimetil-10-oksa-3,5-diokso-4-feniltritsiklo[5,2,11,7,02,6]dets-8-ena*. V kn.: *Materialy 8-y mezhdunarodnoy nauchnoy shkoly "Nauka i*

*innovatsii — 2013*” [Acute toxicity of 4-aza-1-hydroxymethyl-10-oxa-3,5-dioxo-4-phenyltricyclo [5,2,11,7,02,6]dez-8-ena. In: Materials of VIII International Scientific School “Science and Innovations — 2013”. Yoshkar-Ola; 2013; p. 264–265.

7. Козлов В.А., Сапожников С.П., Митрасов Ю.Н., Авруйская А.А., Карышев П.Б., Шептухина А.И., Николаева О.В. Способ флуоресцентного гистологического выявления амилоида. Патент РФ 2611408. 2017. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Mitrasov Yu.N., Avruyskaya A.A., Karyshev P.B., Sheptukhina A.I., Nikolaeva O.V. *Sposob fluorestsennogo gistologicheskogo vyjavleniya amiloida* [Method of fluorescent histological detection of amyloid]. Patent RU 2611408. 2017.

8. Burns J., Pennock C.A., Stoward P.J. The specificity of the staining of amyloid deposits with thioflavine T. *J Pathol Bacteriol* 1967; 94(2): 337–344, <https://doi.org/10.1002/path.1700940211>.

9. Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(6): 384–396, <https://doi.org/10.1038/nrm3810>.

10. Krebs M.R., Bromley E.H., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* 2005; 149(1): 30–37, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.08.002>.

11. Klunk W.E., Pettegrew J.W., Abraham D.J. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(8): 1273–1281, <https://doi.org/10.1177/37.8.2666510>.

12. Held P., Becker K. *Analysis of  $\alpha$ -synuclein fibril formation in vitro. Using fluorescence to monitor protein aggregation in microplates*. Biotek; 2014. URL: <http://www.biotek.com/resources/articles/analysis-of-synuclein-fibril-formation-in-vitro.html>.

13. Baldwin A.J., Knowles T.P., Tartaglia G.G., Fitzpatrick A.W., Devlin G.L., Shammis S.L., Waudby C.A., Mossuto M.F., Meehan S., Gras S.L., Christodoulou J., Anthony-Cahill S.J., Barker P.D., Vendruscolo M., Dobson C.M. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* 2011; 133(36): 14160–14163, <https://doi.org/10.1021/ja2017703>.