

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

С.О.Бачурин

25 декабря 2015 г.



**«МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ НА ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ И ОБРАЗОВАНИЕ  
ФИБРИЛЛ АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ»**

СТП-14.621.21.0008.10-2015

Ответственный исполнитель

Заведующий лабораторией,

к.б.н.

С.Г. Ключков

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

**СОДЕРЖАНИЕ**

|   |   |
|---|---|
| 1. Наименование методики измерений .....  | 3 |
| 2. Назначение методики измерений и область применения .....   | 3 |
| 3. Нормативные ссылки .....   | 3 |
| 4. Погрешность измерений.....   | 4 |
| 5. Требования к показателям точности измерений.....   | 4 |
| 6. Условия измерений .....  | 4 |
| 7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам,<br>материалам, реактивам, применяемым для оценки агрегации амилоидных<br>пептидов ..... | 4 |
| 7.1. Реактивы.....  | 4 |
| 7.2. Материалы .....  | 5 |
| 7.3. Оборудование .....   | 5 |
| 8. Операции при выполнении методики оценки агрегации амилоидных<br>пептидов .....   | 5 |
| 8.1. Подготовка стоковых растворов амилоидных пептидов.....   | 5 |
| 8.2. Подготовка амилоидных пептидов, специфического красителя<br>непосредственно для начала эксперимента.....   | 6 |
| 8.3. Оценка ранних стадий агрегации $\beta$ -амилоидных пептидов<br>(олигомеризация). .....   | 6 |
| 8.4. Оценка поздних стадий агрегации $\beta$ -амилоидных пептидов<br>(фибриллизация).....   | 6 |
| 9. Обработка и оформление результатов измерений.....  | 7 |
| 10. Требования безопасности, охраны окружающей среды .....  | 8 |
| 11. Требования к квалификации операторов.....   | 9 |

## **1. Наименование методики измерений**

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.10-2015 устанавливает методику «Методика оценки влияния на олигомеризацию и образование фибрилл амилоидных пептидов флюорометрическим методом»

## **2. Назначение методики измерений и область применения**

Настоящая методика описывает процедуру оценки агрегации амилоидных пептидов.

Основными областями применения данной методики являются нейронаука - оценка влияния на процессы олигомеризации и фибрилляции амилоидных пептидов различных эндогенных и экзогенных факторов, разработка терапевтических средств.

## **3. Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

#### **4. Погрешность измерений**

Не устанавливаются.

#### **5. Требования к показателям точности измерений**

Агрегация амилоидных пептидов сопровождается увеличением флуоресценции специфического красителя, регистрируемого на планшетном ридере Victor или EnVision (Perkin Elmer, США), контрольные пробы должны показывать статистически значимое увеличение флуоресценции проб в разные временные точки измерений, изображения формирующихся агрегатов получают электронномикроскопически методом негативного контрастирования при увеличении от 4000 до 20000 на электронном микроскопе Philips-EM 420.

#### **6. Условия измерений**

Диапазон температуры окружающей среды для проведения измерений – 18-27°C.

Диапазон увеличения для получения электронных микрофотографий агрегатов - от 4000 до 20000.

#### **7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для оценки агрегации амилоидных пептидов**

##### **7.1. Реактивы**

- β-амилоидные пептиды (1-40 или 1-42) (Bachem, Switzerland)
- Диметилсульфоксид (Sigma, США)

- Буфер PBS (10 mM фосфатный буфер, 100 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА, pH 7,4)
- тиофлавин T (Sigma, США)
- азид натрия (Sigma, США)

## **7.2. Материалы**

- Толстостенные центрифужные пробирки Special Beckman (BeckmanCoulter, США)
- планшеты чёрные для определения флуоресценции,
- сеточки медные для электронной микроскопии

## **7.3. Оборудование**

- ультразвуковой дезинтегратор Sonopuls (Bandelin, Германия)
- Ультрацентрифуга Optima MAX XP (Beckman Coulter, США), ротор MLA-50 с пробирками центрифужными и вкладышами к ним.
- ТС-1/20 СПУ термостат суховоздушный СКТБ (Смоленск)

## **8. Операции при выполнении методики оценки агрегации амилоидных пептидов**

### **8.1. Подготовка стоковых растворов амилоидных пептидов.**

Выбранный  $\beta$ -амилоидный пептид растворяют в ДМСО до концентрации 100 мкМ. Обрабатывают ультразвуком с помощью дезинтегратора Bandelin Sonopuls Ultrasonic Homogenizer HD 2200 мощностью 150 Вт в течение 30 на льду в течении 1 минуты для предотвращения агрегации. Нерастворившиеся агрегаты отделяют центрифугированием при 100000g в течении 60 минут при 40С на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор MLA-50. Аликвоты разливают в криопробирки (по 100 мкл) и помещают в морозильную камеру.

## **8.2. Подготовка амилоидных пептидов, специфического красителя непосредственно для начала эксперимента.**

Непосредственно перед экспериментом 100 мкМ β-амилоид (100 % ДМСО) переводим в PBS буфер (10 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4) до концентрации 10 мкМ и снова центрифугируем при 100000g, 60мин. при 40С на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор MLA-50 для удаления нерастворившихся агрегатов.

Заранее необходимо приготовить 0,3 мМ раствор бензотиазольного красителя тиофлавина Т, специфически взаимодействующего только с бета-структурами агрегатов, в PBS буфере (10 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl, pH 7,4). Профильтровать через стеклянный фильтр. Исходный раствор тиофлавина Т перед работой необходимо развести в 100 раз PBS буфером (10 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl, pH 7,4) до концентрации 3 мкМ. Краситель способен специфическим способом связываться с амилоидными фибриллами в растворах, вследствие чего значительно возрастает квантовый выход его флуоресценции (более, чем в 1000 раз).

## **8.3. Оценка ранних стадий агрегации β-амилоидных пептидов (олигомеризация).**

К 10 мкМ раствору β-амилоидного пептида добавить исследуемое вещество. После необходимой преинкубации в каждую пробу добавляют тиофлавин Т до конечной концентрации 3-5 мкМ.

Исследование ранних стадий агрегации β-амилоидных пептидов (олигомеризация) проводится непосредственно в 96- или 384-луночных планшетах для измерения флуоресценции на планшетном ридере Victor или EnVision (PerkinElmer) при  $\lambda_{ex/em}=450/480\text{нм}$ ,  $t = 37$  в течении 6 часов.

## **8.4. Оценка поздних стадий агрегации β-амилоидных пептидов (фибриллизация).**

Контрольные и опытные пробы, содержащие исследуемое вещество или растворитель, азид натрия и 10 мкМ  $\beta$ -амилоидного пептида, помещают в термостат ( $t=37^\circ$ ). Через 5, 24, 48 и 72 часа инкубации отбираем по 200 мкл раствора для анализа образовавшихся агрегатов флуоресцентным методом и наносим раствор на сеточки для подготовки образцов к электронномикроскопическому анализу структуры агрегатов методом негативного контрастирования. В отобранные пробы для флуоресцентного анализа агрегатов добавляем в тиофлавин Т до конечной концентрации 3 мкМ. Измерения флуоресценции проводится в 96-луночных планшетах на планшетном ридере Victor или EnVision (PerkinElmer) при  $\lambda_{ex/em}=450/480$  нм.

Негативный контроль представляет собой пробу, содержащую все компоненты за исключением собственно амилоидного пептида. Положительный контроль - проба с амилоидным пептидом без дополнительных факторов (в присутствии только соответствующего растворителя).

## **9. Обработка и оформление результатов измерений**

Обработка результатов измерений должна осуществляться с помощью программы WorkOut 2.5 (DazDag, England), установленной на рабочей станции к планшетному ридеру Victor, (Perkin Elmer, США). Кинетические кривые могут быть представлены непосредственно в виде зависимости интенсивности флуоресценции от времени. Дополнительно для кинетических кривых ранних стадий агрегации может быть рассчитана скорость изменения флуоресценции (скорость агрегации) и площадь под кинетической кривой, этот показатель позволяет оценить не только интенсивность агрегации, но и изменения лаг-периода агрегации и плотность образованных агрегатов.

- для оценки поздних стадий агрегации значения флуоресценции образца пропорциональны количеству агрегатов амилоидного пептида и являются показателем этого процесса.

Дальнейшая обработка измерений может включать следующие операции:

- нормирование полученных значений между значениями негативного и позитивного контролей,
- в случае исследования влияния соединений на агрегацию амилоида для соединений-хитов определяется концентрационная зависимость и полученные данные обрабатываются программой для получения значений IC50 (ингибирование агрегации) или EC50 (активация агрегации).

Результаты измерений оформляются в виде таблиц, с использованием табличного редактора MS Excel. В общем случае таблица имеет следующие графы:

| ИД/шифр/код образца | Даты выполнения измерений | Значения показателя | Примечания | ФИО и подпись исполнителя |
|---------------------|---------------------------|---------------------|------------|---------------------------|
|                     |                           |                     |            |                           |

## 10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.



При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

### **11. Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.

**Валидация методики оценки агрегации амилоидных пептидов**

Валидация процесса оценки агрегации амилоидных пептидов проводилась в экспериментах по исследованию влияния на этот процесс новых соединений как перспективных лекарственных средств.

Агрегация амилоидобразующих белков играет важнейшую роль в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности в патогенезе болезни Альцгеймера. Для терапии важно предотвратить как образование олигомерных форм, так и образование фибрилл амилоида, важен поиск ингибиторов агрегации  $\beta$ -амилоида ( $\beta$ А).

В рамках валидации методов определения агрегации  $\beta$ А с тиофлавином Т был проведен эксперимент по оценке влияния алломаргаритарина (АМ) - вещества, обладающего антиоксидантной и металл-хелатирующей активностью на процессы агрегации амилоидного пептида 1-40. Известно, что как свободные радикалы, так и ионы металлов могут провоцировать агрегацию  $\beta$ А. Поэтому соединения, являющиеся хелаторами металлов и проявляющие антиоксидантную активность, могут влиять на патологическую агрегацию амилоида.

При исследовании ранних стадий агрегации  $\beta$ А показано, что АМ увеличивает лаг-период появления ТфТ-положительных агрегатов и снижает их количество (рис. 1). Исследование фибриллизации  $\beta$ А при термостатировании (37°C, 5 часов, 24 часа) показало, что АМ концентрационно-зависимо подавляет образование фибрилл  $\beta$ А (рис. 2).

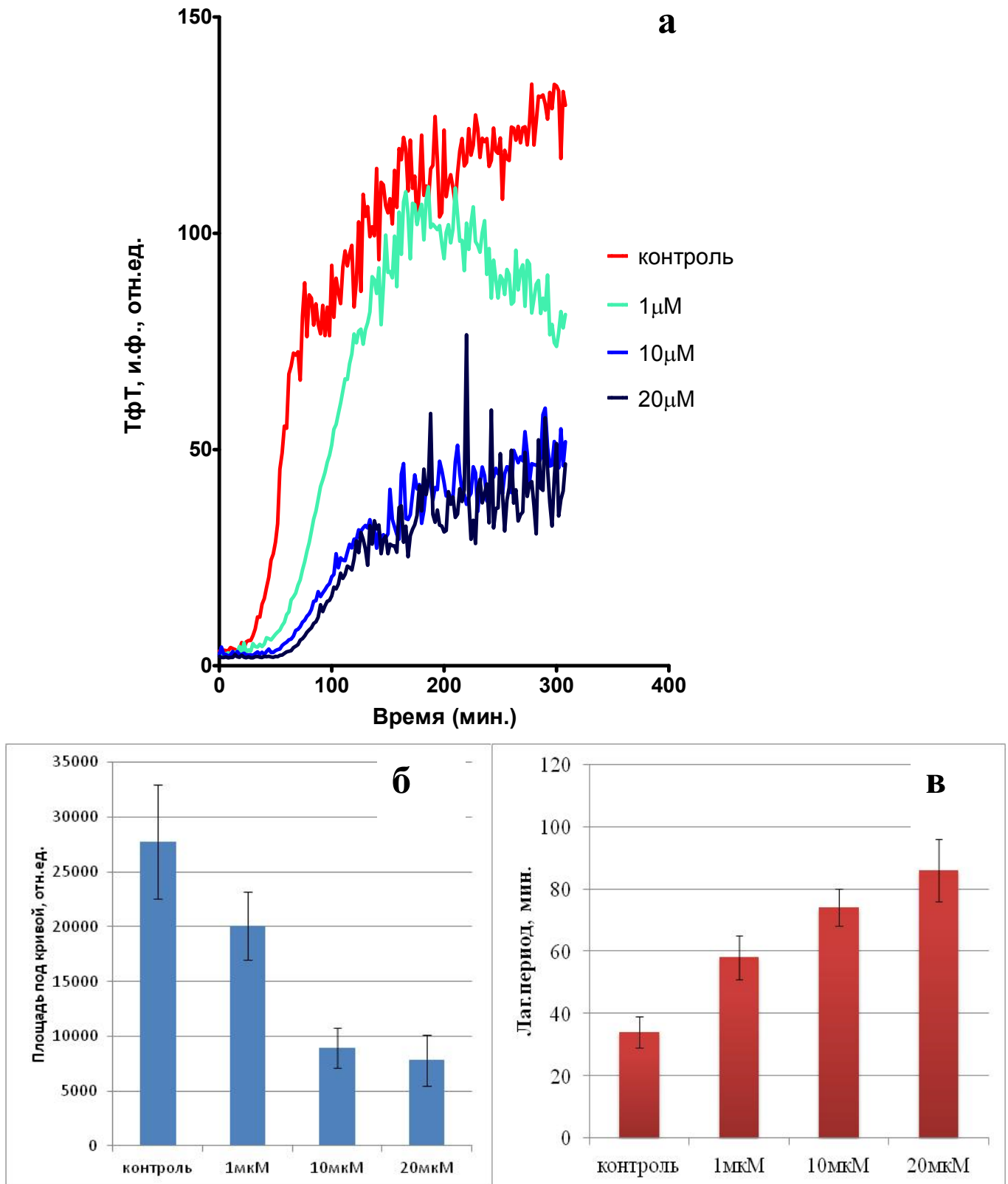


Рис.1. Влияние АМ на ранние стадии агрегации  $\beta A_{1-40}$ : а - кинетическая кривая агрегации, б- площадь под кривой агрегации, в - лаг.период до начала агрегации.

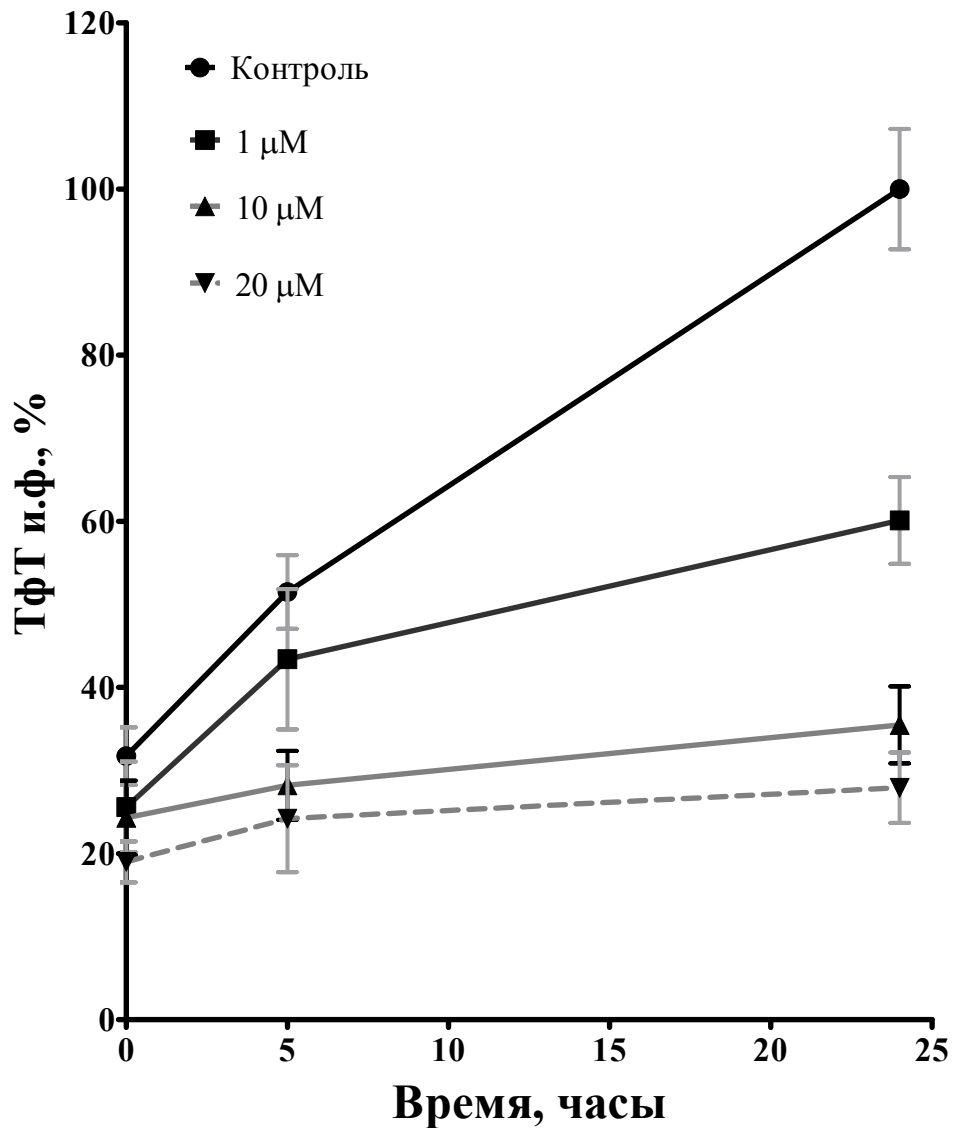


Рис.2. Влияние АМ на поздние стадии агрегации - образование фибрилл  $\beta\text{A}_{1-40}$

Данные эксперимента по валидации представленного метода оценки агрегации амилоидных пептидов подтверждают пригодность метода для оценки влияния различных эндогенных и экзогенных факторов, включая потенциальные лекарственные препараты на процессы олигомеризации и фибриллизации амилоидных пептидов.