

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Кваліфікаційна робота
Освітній ступінь – магістр

на тему: **«ВПЛИВ НІКЕЛЮ НА ПРОЦЕС УТВОРЕННЯ
 β -СТРУКТУРОВАНИХ БІЛКОВИХ АГРЕГАТІВ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання,
Спеціальності 091 Біологія
Крячок Єлизавета Андріянівна

Керівники: Ковальська В. Б.,
доктор біологічних наук, провідний
науковий співробітник відділу
біомедичної хімії Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України

Білько Д. І.,
кандидат біологічних наук, доцент
НаУКМА

Рецензент: Гриненко Т. В., д.б.н

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

«__» _____ 20__ р.

Київ-2020

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальні відомості про рівні структури білків, молекулярні механізми їх ушкодження та його наслідки.	6
1.2. Особливості β -укладки поліпептидних ланцюгів та утворюваних нею агрегатів.	8
1.2.1. Особливості структури та властивостей сироваткового альбуміну людини.	12
1.2.2. Патологічні наслідки утворення β -структурованих агрегатів.	13
1.3. Вплив нікелю на агрегаційну здатність білків та алергічні реакції.	16
1.4. Методи виявлення β -структурованих білкових агрегатів.	19
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	27
2.1. Об'єкти дослідження.	27
2.2. Обладнання та реактиви, що були використані в дослідженні.	27
2.3. Методика дослідження агрегаційних властивостей білків.	28
2.3.1. Моделювання агрегаційних процесів в білкових розчинах.	29
2.3.2. Мікроскопічні та ІЧ-спектроскопічні дослідження утворених агрегатів.	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	34
3.1. Моделювання процесу утворення β -структурованих білкових агрегатів за умов <i>in vitro</i>	34
3.2. Вплив нікелю на процес утворення β -структурованих білкових агрегатів	39
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Функціональна активність білків визначається їх структурою. Відомо, що під впливом різноманітних чинників білки зазнають конформаційних змін, що позначаються на їх функціональній активності, розчинності, імуногенності та різноманітних властивостях, що впливають на функціонування білків в організмі та істотно обмежують застосування білкових препаратів. Денатурація може бути зворотною чи незворотною, залежно від здатності чи нездатності білкової молекули повертатись в активний стан. В останні роки дедалі більшої уваги зазнають процеси, пов'язані з утворенням β -структурованих білкових агрегатів – нерозчинних асоціатів білкових молекул, що визначаються не лише високою резистентністю до впливу захисних систем організму, але й здатні до автохтонного росту за рахунок сорбції та перебудови в β -складчасті структури розчинних білків. Зумовлено це високою енергетичною вигідністю агрегаційного процесу, що призводить до розвитку так званих конформаційних захворювань, до яких належать хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Кройцфельда-Якоба та різноманітні амілоїдоза – патологічні стани, пов'язані з нефункціональною агрегацією білків. Здатність білків центральної нервової системи виконувати їх специфічні біологічні функції втрачається, зокрема, при утворенні замість білкових глобул нерозчинних амілоїдних фібрил, схильних до агрегації [1]. На сьогоднішній день подібні нейродегенеративні захворювання невиліковні, проте визнана необхідність їх ранньої діагностики. Тому є актуальним розширення кола фізичних методів, за допомогою яких можна спостерігати конформаційні зміни білкових молекул. Утворення β -структурованих агрегатів також супроводжує отримання, зберігання та застосування білкових препаратів медичного призначення. Це не лише зменшує функціональну активність препарату, але й обумовлює його імуногенність. Тому дослідження механізмів утворення β -структурованих агрегатів, пошуки підходів до їх запобігання

знаходяться у фокусі уваги провідних лабораторій світу. Доведено, що схильність того чи іншого білка до утворення агрегатів обумовлена його первинною послідовністю [2]. До класичних амілоїдогенних білків належать інсулін та лізоцим, оскільки їх первинна послідовність містить так звані амілоїдогенні кластери.

Посилення впливу продуктів промислової діяльності становить наукову та соціальну проблему, що обумовлює розвиток багатьох захворювань та істотно знижує якість життя людей. До подібного роду продуктів належить нікель – метал, що широко застосовується в якості захисного покриття металевих виробів, які за контакту зі шкірою можуть викликати алергічну реакцію, а саме контактний дерматит. Існує думка, що подібна реакція обумовлена здатністю іонів нікелю до формування комплексних сполук з аміногрупами білків, що призводить до денатурації та розвитку імунної реакції на денатурований білок.

Функціональні ускладнення, зумовлені відкладенням β -структурованих білкових депозитів, становлять вкрай тяжку та далеку від розв'язання біохімічну, медичну та соціальну проблему. Дослідження механізмів утворення β -структурованих білкових агрегатів, проведення моделювання фібрилоутворюючого процесу та виявлення можливості індукованої іонами нікелю агрегації білків сироватки крові людини становить необхідну передумову для пошуку шляхів запобігання розвитку великої кількості захворювань, а в перспективі - й для їх лікування.

Тому метою роботи було провести моделювання процесів утворення β -структурованих білкових агрегатів лізоциму та альбуміну та дослідження денатуруючого впливу іонів нікелю на розчинні білки. Дослідження особливостей утворених денатурованих похідних проводили за допомогою мікроскопічних методів та за участі специфічного до β -структурованих білкових агрегатів барвника – Конго червоного.

Відповідно до наведеної мети роботи сформульовано наступні **завдання:**

1. Провести моделювання процесів утворення структурованих білкових фібрил на прикладі яєчного лізоциму.
2. Провести дослідження денатуруючого впливу іонів нікелю на розчинні білки за умов, наближених до *in vivo*.
3. Дослідити структуру утворених агрегатів за допомогою специфічного до β -складчастих листків барвника – Конго червоного.
4. Провести порівняльну оцінку застосованих дослідницьких методів щодо можливостей виявлення β -структурованих білкових депозитів.

Дослідження проводили в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні відомості про рівні структури білків, молекулярні механізми їх ушкодження та його наслідки

Відомо, що білкові молекули є активними лише в так званій нативній, суворо визначеній для кожної з десятків тисяч білків, конформації – способі укладки поліпептидного ланцюга [2]. Визначають чотири рівні білкової структури. Первинна структура кожної з білкових молекул задається генетично і протягом життя даного організму залишається незмінною. Вторинна структура утворюється внаслідок іонних, гідрофобних, водневих, Ван-дер-Ваальсових та торсійних взаємодій між амінокислотними залишками поліпептидного ланцюга, тобто значною мірою задається первинною послідовністю молекули. Найпоширенішими елементами вторинної структури білків є α -спіралізовані ділянки, β -укладки, кілька типів стандартних перегинів ланцюга та неструктуровані ділянки. За належного просторового розміщення всі ці елементи утворюють третинну структуру білкової глобули. Третинна структура складається з елементів вторинної та визначає загальну конформацію білкової молекули. Четвертинна структура притаманна лише олігомерним білкам, що складаються з кількох однакових субодиниць [3].

Нативна структура білка являє свого роду компроміс між комплексом внутрішньомолекулярних взаємодій білкової молекули та різноманітними факторами зовнішнього оточення. Забезпечення фолдингу білку, що синтезується *de novo*, забезпечується дією так званої шаперонової системи організму – складного комплексу білкових молекул, що забезпечують укладання новоутвореного білка в правильну конформацію. Ця ж система забезпечує поверхнєве “рихтування” білків, забезпечуючи тим самим їх функціонально активний стан. Білкові молекули, що зазнали незворотного ушкодження структури через протеолітичне розщеплення чи асоціативні

процеси, вилучаються з організму за допомогою так званого протеасомного комплексу – складної системи, що забезпечує розпізнавання відпрацьованих білків, їх мічення та розщеплення до амінокислот (Рис. 1.1) [4].

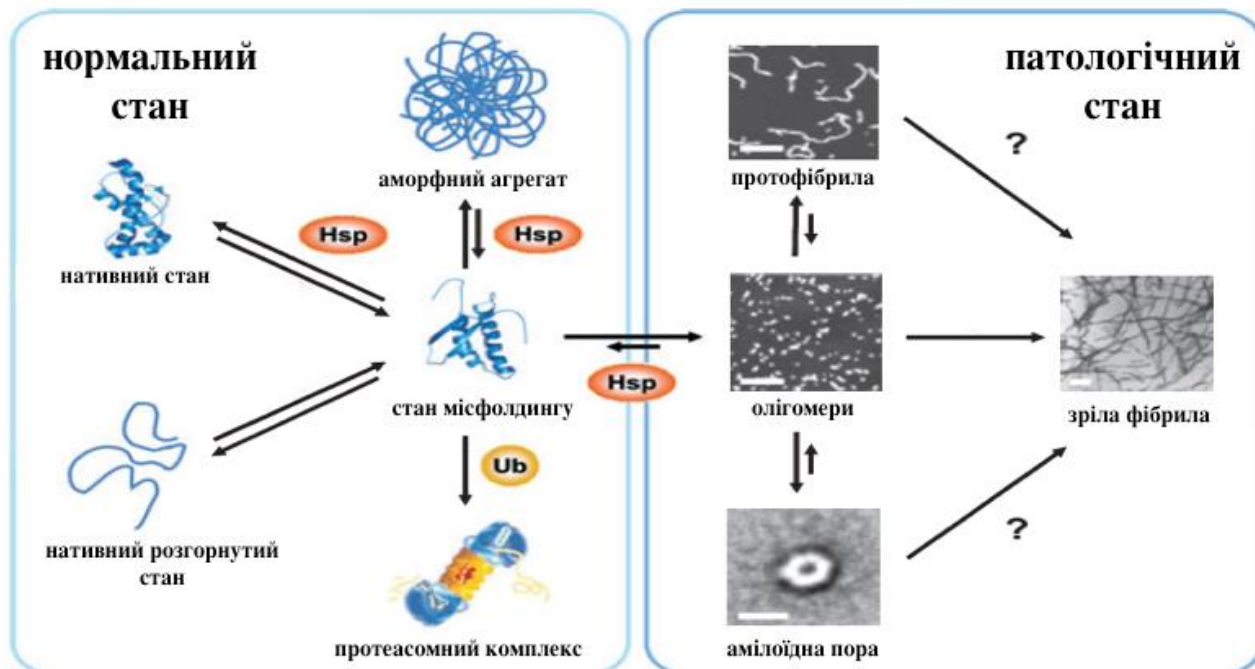


Рис. 1.1. Схематичне зображення основних факторів, що впливають на фолдинг та елімінацію білків [4].

Тобто формування нативної структури і підтримання білкової молекули в функціонально активній формі являє собою складний та динамічний процес, опосередкований комплексом внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій [5]. Істотне порушення зовнішнього оточення білкової молекули позначається на її конформаційному стані, призводячи до зворотної чи незворотної денатурації. Навіть зворотня денатурація білкових молекул супроводжується зближенням окремих реакційноздатних груп, експозицією раніше прихованих амінокислотних залишків і зв'язків, підвищенням ступеня напруженості останніх. Все це не лише змінює загальну молекулярну динаміку білкової молекули, але й призводить до утворення нових ковалентних зв'язків, що робить денатурацію необоротною [6]. Обумовлена щільним стеричним контактом висока локальна щільність окремих реакційноздатних груп

дозволяє говорити про особливий, предферментативний, характер подібних реакцій, що відбуваються як в розчині, так і в зневоднених препаратах [7].

Важливим чинником, що впливає на збереження молекулою нативної конформації, є ступінь її гідратованості [6]. Саме завдяки гідратній оболонці білкові молекули перебувають в розчинному стані та не агрегують між собою.

Таким чином, формування нативної структури білків та підтримка функціонально активних форм молекул білків - це складні та динамічні процеси, опосередковані складними внутрішньо- і міжмолекулярними взаємодіями. Порушення нативної структури та зовнішнього оточення білкових молекул призводить до зворотної чи незворотної денатурації та порушення конформації молекули.

1.2. Особливості β -укладки поліпептидних ланцюгів та утворюваних нею агрегатів

Агрегація білків протікає як *in vivo*, так і *in vitro* в результаті стресових впливів, що порушують нативну структуру білка. До таких чинників відносяться підвищення температури, зміна рН, механічний вплив (наприклад, при перемішуванні), цикли заморожування і відтавання [8,9]. Високі температури руйнують четвертинну, третинну і вторинну структуру білків. Такого роду дестабілізація призводить до експонування гідрофобних ділянок, в яких потім ініціюється агрегація, задля мінімізації не вигідних взаємодій цих ділянок з водним оточенням. Зміни рН можуть призводити до зміни заряду основних і кислотних груп бічних ланцюжків амінокислот в білках, порушуючи електростатичні взаємодії і дестабілізуючи нативну структуру білків.

Ефективний заряд на поверхні молекули білка має значний вплив на його колоїдну стабільність. На цей заряд впливають параметри розчину, такі як рН та іонна сила. Додавання солей зазвичай призводить до екранування зарядів на поверхні білка. Це зменшує сили відштовхування між білковими

молекулами, що, в свою чергу, збільшує схильність до агрегації [10]. В процесі заморожування і відтавання відбуваються складні фізичні і хімічні процеси, включаючи утворення поверхонь розділення між льодом і рідиною, адсорбція і криоконцентрація білків та солей буфера [11], зміна рН у зв'язку з кристалізацією компонентів буфера [12]. Ці зміни можуть індукувати денатурацію та агрегацію білків.

Одним з основних елементів вторинної структури білків є β -укладка – своєрідна “ламана” орієнтація поліпептидного ланцюга, що спільно з α -спіралізованими та неструктурованими ділянками утворює вторинну структуру більшості білків. Нерідко в складі білкової глобули знаходяться β -складчасті листки, утворені взаємно фіксованими водневими зв'язками C=O та NH-груп окремих поліпептидних ланцюгів (тяжів). Подібні структури начебто розміщені на поверхні зігнутого паперового листка (Рис. 1.2).

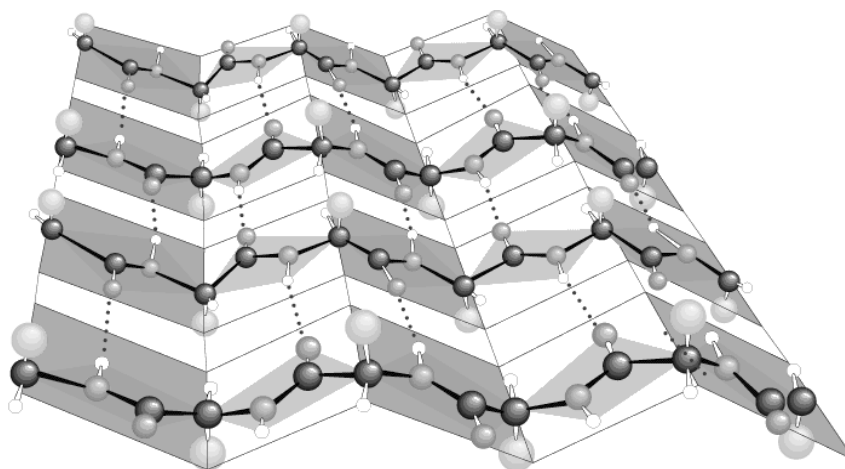


Рис. 1.2. Схематичне зображення β -складчастих листків [13].

Мінімальна протяжність тяжа – 6 амінокислотних залишків, а в ширину β -складчастий лист зазвичай містить від 4 до 6 тяжів, орієнтованих в протилежних або в одному напрямках (антипаралельна та паралельна складчасті структури, відповідно). Зазвичай зустрічаються антипаралельні β -складчасті листи, оскільки їх утворення є енергетично вигіднішим.

В той же час β -структурованій укладці поліпептидного ланцюга притаманні властивості, що за певних патологічних станів зумовлюють тяжкі порушення у функціонуванні організму. До них належать:

- висока енергетична вигідність утворення β -структури, що забезпечує високу її стабілізацію та опірність до дії протеолітичних ферментів;
- здатність до сорбції розчинених білків та їх перебудови за своєю подібністю, що веде до утворення β -структурованих агрегатів.

Тобто нерозчинний білок відіграє роль своєрідної матриці, здатної розростатись за рахунок сорбції та перебудови розчинних білків з утворенням β -структурованих білкових агрегатів [14-16]. Через енергетичну вигідність цього процесу його перебіг відбувається спонтанно, без ферментативного каталізу, в бік мінімізації вільної енергії молекули. Тобто здатність стабілізованих β -структурованих матриць індукувати конформаційну перебудову білків, що з ними зв'язалися, не лише здатна призводити до порушення структури і інактивації останніх, але й веде до формування нового шару β -структурованого білка [15]. Подібний автохтонний процес призводить до формування β -структурованих фібрилярних агрегатів – свого роду “енергетичного дна” всіх можливих конформаційних станів білкових молекул (Рис. 1.3 та Рис. 1.4).

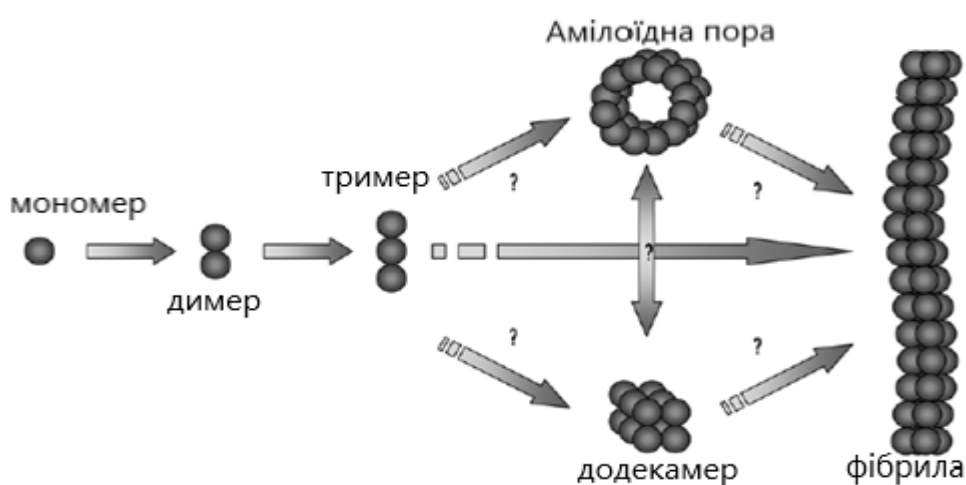


Рис. 1.3. Молекулярний каскад утворення β -структурованих фібрил [17].

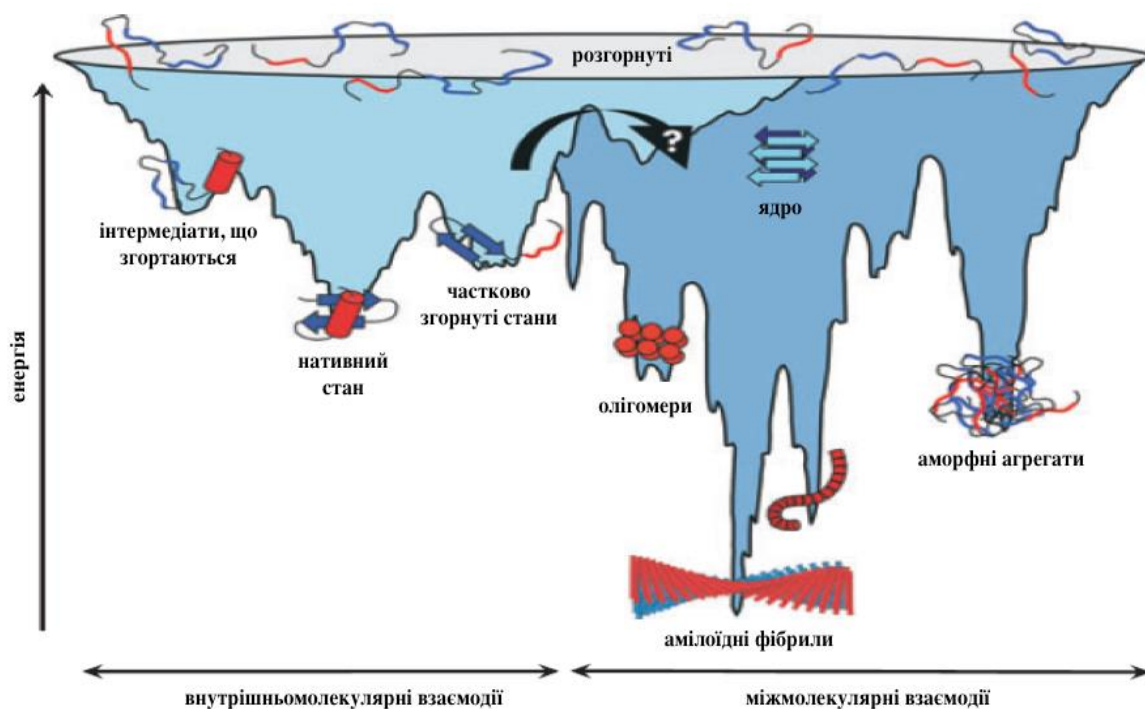


Рис. 1.4. Схематичне зображення розподілу енергії білкових молекул за різного [4].

Однією з форм утворення β -структурованих фібрил є сфероліти – волокнисто-радіальні утворення, що виявляють оптичну активність та при дослідженні в поляризаційній мікроскоп дають характерну картину “мальтійського хреста” (Рис. 1.5).

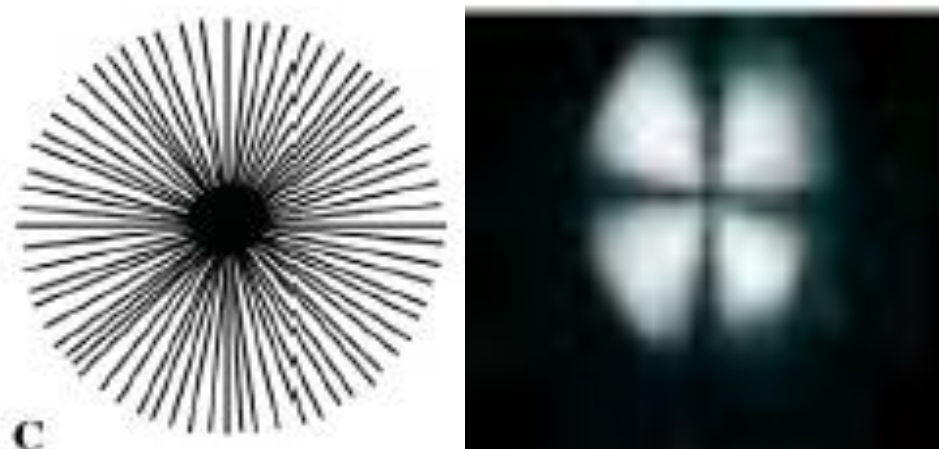


Рис. 1.5. Волокнисто-радіальна структура сфероліту та його вигляд при спостереженні в поляризаційному мікроскопі [18].

Первинною β -структурованою матрицею подібних процесів можуть бути ушкоджені білки, що не набули нативної структури або втратили її. Через енергетичну вигідність процесу перебудова протікає спонтанно, без участі будь-яких ферментів, а утворені структури не лише функціонально неактивні, але й порушують нормальне функціонування організму. Джерелом білків, придатних до ініціювання та підтримки подібних процесів, можуть бути найрізноманітніші компоненти ендогенної інтоксикації – патогенні продукти порушеного білкового обміну, які накопичуються в організмі та є умовою для розвитку запальних процесів. Порушення конформаційної стійкості протеїнів може стати наслідком змін внутрішнього середовища організму - ацидозу, алкалозу, відхилень від норми осмотичного або онкотичного тиску; надмірного накопичення білків зі зміненою конформацією [19]. Найтяжчим проявом наслідків подібного комплексу властивостей є амілоїдози - тяжкі ускладнення багатьох захворювань. Однак це – крайній і в більшості випадків летальний прояв утворення структур, що не мають нічого спільного з вихідною нативною конформацією перебудованих білків. Значно поширенішим прикладом є розвиток алергії на нікель – подразнення шкіри, обумовлене безпосереднім контактом з нікелем та нікель-вміщуючими сплавами. Подібна реакція є досить поширеною і спостерігається приблизно у 10% людей в світі.

Таким чином, денатурація та агрегація білків з порушенням їх конформації може призводити до тяжких наслідків різноманітного характеру, що є основою для досліджень провідних лабораторій світу.

1.2.1. Особливості структури та властивостей сироваткового альбуміну людини.

Понад половину білків плазми крові становить сироватковий альбумін. Сироватковий альбумін людини - це неглікозильовані протеїн [20], має негативний заряд і являє собою поліпептидний ланцюг з 585 амінокислот з

молекулярною масою 66,5-70,0 кДа, первинну послідовність яких була визначена незалежно J.K. Brown та В. Melonn. Між амінокислотними залишками вищенаведеного білка утворюються водневі зв'язки, і ділянки білкової молекули укладаються в альфа-спіралі (Рис. 1.6).



Рис. 1.6. Просторова структура сироваткового альбуміну людини (α -спіралізовані ділянки зображено червоними спіралями) [21].

Сироватковий альбумін забезпечує перенесення з кров'ю різноманітних речовин, що малорозчинні самі по собі, однак відіграють важливі функціональні ролі чи підлягають вилученню з кровообігу. До них належать жирні кислоти, білірубін, солі жовчних кислот, різноманітні ліки та гормони. Зв'язування з альбуміном змінює ефективну концентрацію токсичних речовин, здатних у вільному стані у той чи інший спосіб впливати на організм людини. Подібно до більшості білків, сироватковий альбумін при денатурації схильний до згортання. Нас цікавило виявлення можливості індукованого іонами нікелю переходу від α -спіралізованої структури до найбільш енергетично вигідної β -складчастої [22]. Тому для наших досліджень за модельний білок було обрано саме сироватковий альбумін людини.

1.2.2. Патологічні наслідки утворення β -структурованих агрегатів.

Амілоїдози складають різноманітну групу захворювань, за яких нормальні білки утворюють депозити β -структурованих агрегатів [23]. Подібні депозити можуть бути локальними, органоспецифічними або генералізованими, вони утворюються в найрізноманітніших тканинах і органах і пов'язані з порушенням нормального функціонування організму [24]. Окрему як за локалізацією, так і за характером ураження тканин групу складають амілоїдози центральної нервової системи, включаючи хвороби Альцгеймера, Крейцфельда-Якоба, Паркінсона та інші, що супроводжуються утворенням і накопиченням депозитів β -структурованих білків та прогресуючим ураженням клітин центральної нервової системи [25,26]. Згідно прийнятої класифікації, розрізняють первинну, вторинну і спадкову форми амілоїдозу [23]. За великого різноманіття амілоїдних захворювань білковим депозитам властива загальна риса – високий вміст β -структурованого білка, чий β -складчасті шари орієнтовані паралельно головній осі фібрили, формуючи основу стабільного і нерозчинного в умовах *in vivo* амілоїдного агрегата. Відомо принаймні 25 амілоїдогенних білків, проте будь-яких загальних закономірностей стосовно їх складу не виявлено [27]. Їх єдиною спільною рисою є здатність за певних умов формувати агрегати [28]. Найбільш розповсюджені форми амілоїдів утворені легкими або важкими ланцюгами імуноглобулінів.

Переважає більшість амілоїдогенних білків виявляє зв'язуючі властивості, що забезпечує переважне їх зв'язування саме з β -структурованою поверхнею зростаючого агрегату. Порушення нативної структури білка сприяє β -агрегації [29-31]. Для більшості амілоїдозів причиною утворення стартової β -структурованої матриці може бути контамінація клітинної мембрани різними формами структурно пошкоджених білків і пептидів, які утворюються в надлишку при ендогенній інтоксикації організму [32]. Певна частина продуктів надмірного протеолізу при недостатній функції кліренсових систем здатна до вбудовування в клітинні мембрани. Наступне структуроутворення

за взаємодії з подвійним фосfolіпідним шаром (мембранний фолдинг) призводить до утворення β -агрегатів [33]. Не менш істотною причиною спонукання білків до нефункціональної агрегації є порушення їх структури на стадії біосинтезу. Це також призводить до тяжких наслідків. Зокрема, застосування таких цитостатиків, як цис-платин та доксорубіцин, пов'язане з цілою низкою тяжких побічних ефектів, серед яких провідне місце посідає кардіоміопатія. Розвиток фіброзу серцевого м'яза є прямим наслідком порушення нормального синтезу білка ще на стадії зчитування генетичної інформації з молекули ДНК (Рис. 1.7).

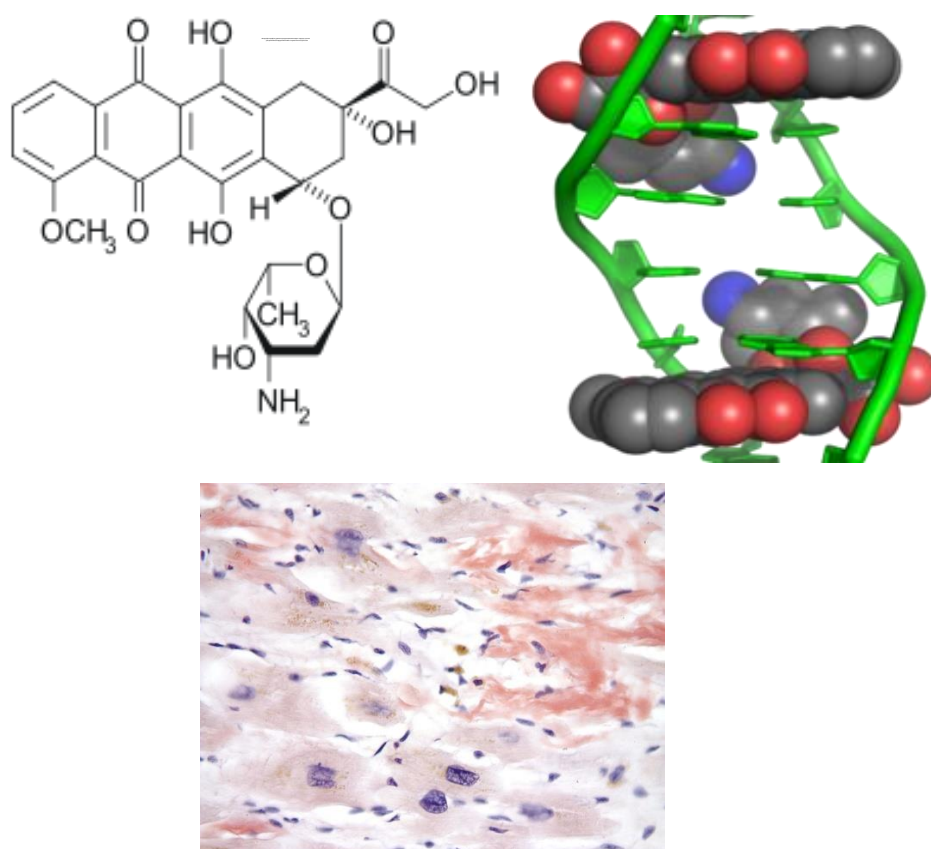


Рис. 1.7. Структура доксорубіцину, модель вбудови його молекул в подвійну спіраль ДНК та забарвлені Конго червоним амілоїдні структури в тканині міокарду [34].

Утворені внаслідок порушення нормального зчитування гену білкові похідні не матимуть збалансованої нативної структури, а отже – будуть схильними до агрегаційних процесів в тканинах організму.

Денатураційні процеси, що їх зазнають білкові препарати протягом очистки та зберігання також призводять до утворення агрегованих форм, що зумовлює не лише зменшення активності препарату, але й робить його імуногенним. Характерним наслідком таких процесів є розвиток так званої інгібіторної форми гемофілії – ускладнення, зумовленого аутоімуними процесами, індукованими рекомбінантними препаратами зсідання крові [35]. Не менш відомим прикладом небажаної агрегації білка є перетворення препаратів інсуліну. Розвиток імунної відповіді на введення подібних препаратів не лише зменшує ефективність їх терапевтичного застосування, але й може призводити до розвитку непередбачуваних наслідків аутоімуного, алергічного та анафілатоксичного характеру [36].

1.3. Вплив нікелю на агрегаційну здатність білків та алергічні реакції.

Нікель – типовий метал білого сріблястого кольору, що завдяки здатності покриватись тонкою оксидною плівкою не зазнає видимого окиснення на повітрі, що спільно з порівняно невеликою вартістю обумовило його широке застосування для гальванічного захисного покриття більш активних металів та найрізноманітніших предметів побуту. Домішка нікелю в міді надає їй сріблястого кольору, обумовивши поширення різноманітних варіантів нейзильберових, томпакових, мельхіорових та багатьох інших мідно-нікелевих сплавів. В другій половині XIX сторіччя було з'ясовано, що домішка нікелю різко збільшує механічні властивості сталі, що спричинило свого роду революцію в чорній металургії та започаткувало використання так званих легуваних сталей. Сплави ж на основі нікелю відзначаються не лише значною механічною міцністю, але й хімічною стійкістю та жаростійкістю. Саме металургія та гальванотехніка є основними галузями застосування нікелю.

Дедалі ширшого застосування зазнають нікель-вмісні лужні акумулятори, що значно легші за традиційні свинцеві.

Як хімічний елемент нікель (Ni) належить до VIII побічної групи 4 періоду періодичної системи. Його зовнішня електронна оболонка - $3d^84s^2$ - через що найбільш стійкими сполуками нікелю є стан окиснення Ni^{2+} . Відповідно до свого знаходження в ряду електрохімічної напруги: $Li \rightarrow Rb \rightarrow K \rightarrow Ba \rightarrow Sr \rightarrow Ca \rightarrow Na \rightarrow Mg \rightarrow Al \rightarrow Mn \rightarrow Cr \rightarrow Zn \rightarrow Fe \rightarrow Cd \rightarrow Co \rightarrow Ni \rightarrow Sn \rightarrow Pb \rightarrow H \rightarrow Sb \rightarrow Bi \rightarrow Cu \rightarrow Hg \rightarrow Ag \rightarrow Pd \rightarrow Pt \rightarrow Au$, нікель здатен до взаємодії з кислотами з утворенням відповідних солей двовалентного нікелю, забарвлених в зелений колір. По відношенню до лугів нікель інертний, що призвело до його застосування в апаратах хімічної технології. Цікавою властивістю нікелю є його здатність утворювати з оксидом карбону (II) високотоксичний летючий тетракарбоніл нікелю $Ni(CO)_4$, що використовується для отримання цього металу за найвищої очистки [37].

Вплив кобальту (Co), хрому (Cr) та нікелю (Ni) на організм людини відбувається часто через контакт зі шкірою та з різними стоматологічними та ортопедичними імплантатами [38]. Іони металів зв'язуються з білками, що може викликати структурні зміни та агрегацію цих білків, з різними медичними наслідками.

На прикладі сироваткового альбуміну людини було встановлено, що всі іони металів здатні викликати агрегацію, і цей ефект значно посилюється, коли замість будь-якого одного типу присутня суміш усіх трьох іонів металів. Таким чином, іони металів індують агрегацію синергічно.

Спектроскопічні дослідження показали, що більшість молекул білка зберігають свою альфа-спіральну вторинну структуру та конформацію. Це дослідження підкреслює важливість синергетичного впливу іонів металів та їх осадів на агрегацію білків [39].

Дослідження на мишах показали, що алергічні реакції на Co є більш вираженими після сенсibilізації в присутності іонів Co та Ni порівняно з іонами Co без додавання Ni [40]. Відомо, що іони нікелю здатні до утворення

комплексних координаційних сполук, зокрема – з аміаком та амінами. Це надає йому здатності ефективно зв'язуватись з білками, порушуючи їх структуру.

Нікель є суттєвою передумовою алергічного контактного дерматиту та наразі складає близько 8,6% захворюваності в світі [41], серед молодих жінок - ще вище, близько 17% [42]. 12,9% населення Центральної Європи, які пройшли тестування патч-тестами, показали позитивну реакцію на цей метал [42].

Генетична схильність може відігравати роль в розвитку захворювання, та жінки, сенсibilізовані до нікелю, мають більш високу частоту антигенів HLA-B35 і BW22 [43].

Сенсibilізація може відбуватися таким чином:

- через контакт з шкірою;
- через контакт з глибокими тканинами (протези суглобів, кардіостимулятори, зубні протези);
- через контакт з тканинами слизової оболонки (внутрішньоматкові контрацептиви);
- з прийомом їжі.

Середньодобове споживання нікелю варіює від країни до країни в залежності від концентрації його в ґрунті та питній воді, а також в залежності від харчових звичок. Рівень споживання варіює від 200 мг / добу в Європі [44] до 300-600 мг / добу в США [45].

Індукований нікелем алергічний контактний дерматит (Ni-АКД) виникає, коли певний металевий предмет, що зазнав корозії під впливом біологічних рідин організму людини (піт, слина та ін.), виділяє вільні іони нікелю, які діють на організм людини як гаптени, викликаючи сенсibilізацію [46,47].



Рис. 1.7. Подразнення шкіри та набряк в місці контакту шкіри з нікель-вміщуючими об'єктами. [48].

Алергічні реакції на нікель можуть проявлятися у формі алергічного контактного дерматиту (АКД) (Рис. 1.7). При розвитку даного виду алергічної реакції можна виділити 2 фази: сенсibilізація і клінічно виражена маніфестація. Сенсibilізація не завжди призводить до розвитку АКД. Активація антигенпрезентуючих клітин обумовлена тривалим контактом шкіри з гаптенем (хімічною речовиною малої молекулярної маси), потім відбувається транспорт гаптен-специфічних Т-клітин в лімфатичні вузли з подальшою продукцією медіаторів запалення, що призводить до розвитку клінічних проявів Ni-АКД.

Таким чином, індукований нікелем алергічний контактний дерматит може бути спричинений контактом з металевим предметом, що містить нікель та зазнав корозії під впливом біологічних рідин організму людини, з подальшим виділенням вільних іонів нікелю, які діють на організм людини як гаптени, викликаючи сенсibilізацію.

1.4. Методи виявлення β -структурованих білкових агрегатів.

Враховуючи тяжкість наслідків утворення β -структурованих білкових агрегатів як за умов *in vivo*, так і *in vitro*, питання постійного удосконалення

методів їх виявлення належить до актуальних напрямків сучасної біохімії та молекулярної біології [49]. Більшість з подібних методів ґрунтується на здатності регулярної структури амілоїдів зв'язувати барвники, інертні по відношенню до нормальних тканин. Це призводить до утворення хромофорів та флуорофорів, якісно відмінних від оточуючих тканин. Загальновизнаним барвником подібного роду є Конго червоний, відомий як стійкий текстильний барвник з 80-х років XIX сторіччя та здатний високовибірково сорбуватись на поверхні β -структурованих білкових агрегатів (Рис. 1.8). На здорових тканинах цей барвник практично не сорбується через відсутність структурної відповідності.

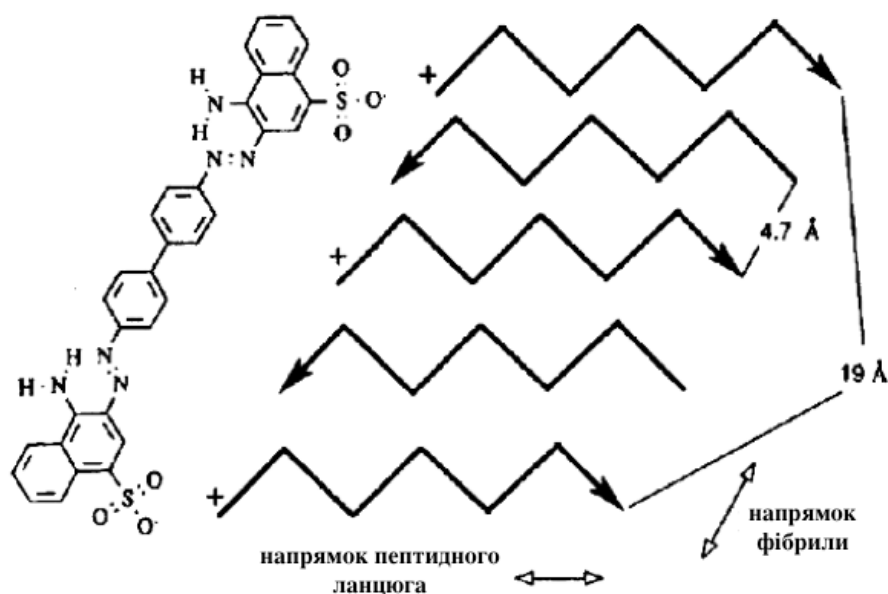


Рис. 1.8. Структурна формула барвника Конго червоного та схематичне зображення його розміщення на поверхні β -складчастого листка [50].

Для більш доказового виявлення утвореного хромофора застосовують поляризаційну мікроскопію (Рис. 1.9). Оскільки кожен з квантів світла являє собою окрему, поперечно-орієнтовану хвилю (Рис. 1.9, а), а орієнтація цих хвиль у світловому потоці має хаотичний характер (Рис. 1.9, б), то

пропускання світла через оптично анізотропний фільтр (поляризатор) дає змогу отримати певним чином орієнтовані хвилі, тобто поляризованого світла (Рис. 1.9, в). При розміщенні на його шляху іншого поляризатора (аналізатора) перпендикулярно по відношенню до першого, світло гаситься повністю. Якщо між поляризатором та аналізатором розміщено оптично активний об'єкт, що відхиляє поляризоване світло, то саме його й буде видно на темному фоні.

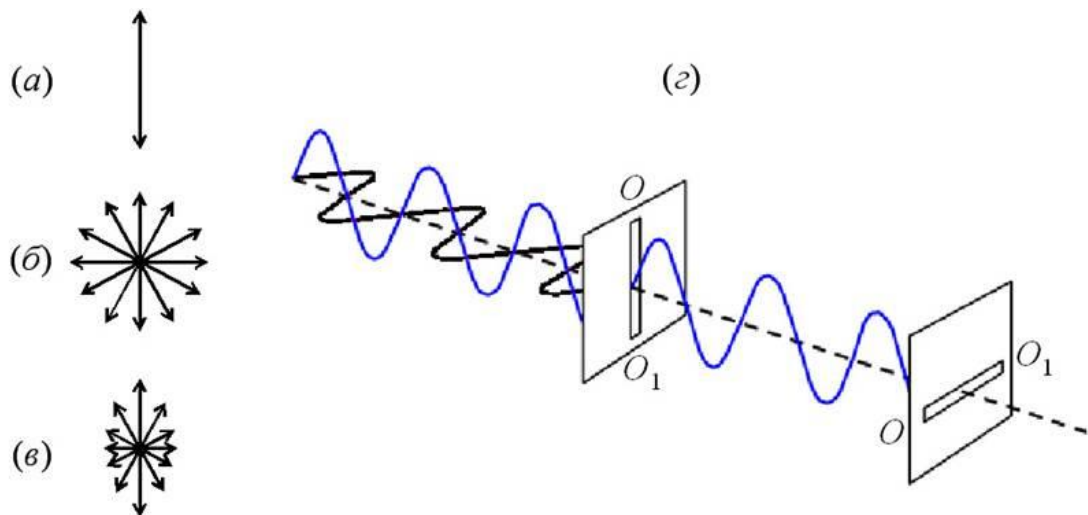


Рис. 1.9. Принцип будови поляризаційного мікроскопа [51].

При поляризаційній мікроскопії забарвлені Конго червоним β -складчасті білкові агрегати спостерігаються забарвленими в яблучно-зелений колір на фоні затемнених тканин, що не здатні відхиляти поляризоване світло. При цьому видимими виявляються саме білкові агрегати, а не окремі β -структуровані ділянки в складі нормальних білків (Рис.1.10).

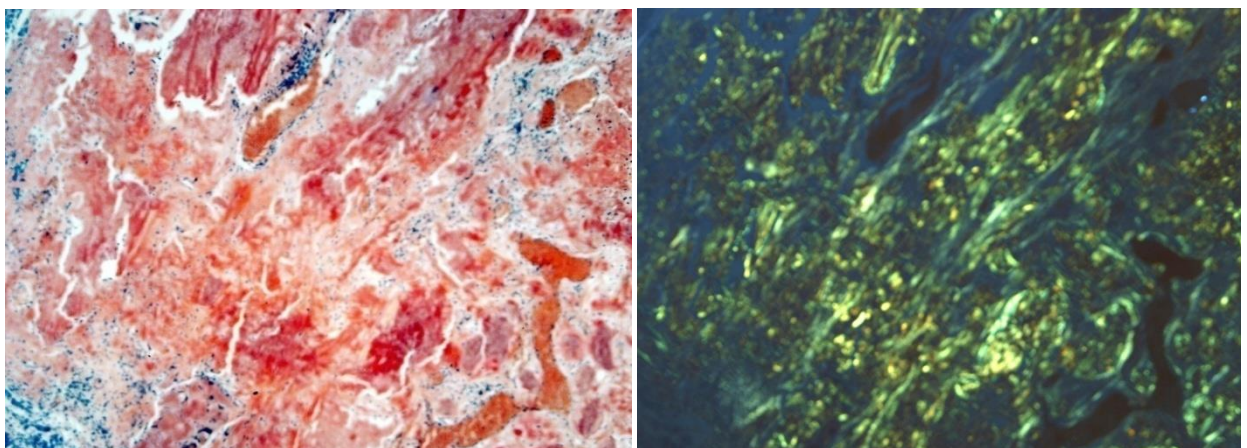


Рис. 1.10. Уражені амілоїдозом тканини гортані після забарвлення Конго червоним в звичайному (ліворуч) та поляризованому (праворуч) мікроскопі. X200 [52].

Важливою перевагою барвника Конго червоного є його біосумісність, що дає змогу виявляти амілоїдози за рахунок визначення кількості сорбованого барвника, введеного в кровообіг пацієнта (проба Бенгольда). Стосовно теми нашого дослідження важливою властивістю Конго червоного є його здатність стимулювати незворотне осадження мікрочасток β -структурованих агрегатів. Це створює передумови для виявлення нанорозмірних агрегатів, які важко виявити у інший спосіб. Як відомо, дифракційне обмеження Аббе унеможлиблює спостереження об'єктів, чий розмір менші за 0.61 довжини хвилі світла. Тому для зеленого кольору ($\lambda \sim 520$ нм) об'єкти, менші за 300 нм (0,3 мікрон) лишаються невидимими. Це зумовлює інтенсивні пошуки барвників, що формують з амілоїдними структурами флуорофори – макромолекулярні утворення, які поглинають світло за однієї довжини хвилі і випромінюють за іншої. Так, застосування люмінесцентної мікроскопії при використанні Конго червоного дозволяє виявити в тканинах значно менші включення білкових β -агрегатів, невидимих в світловий та поляризаційний мікроскоп (Рис. 1.11).

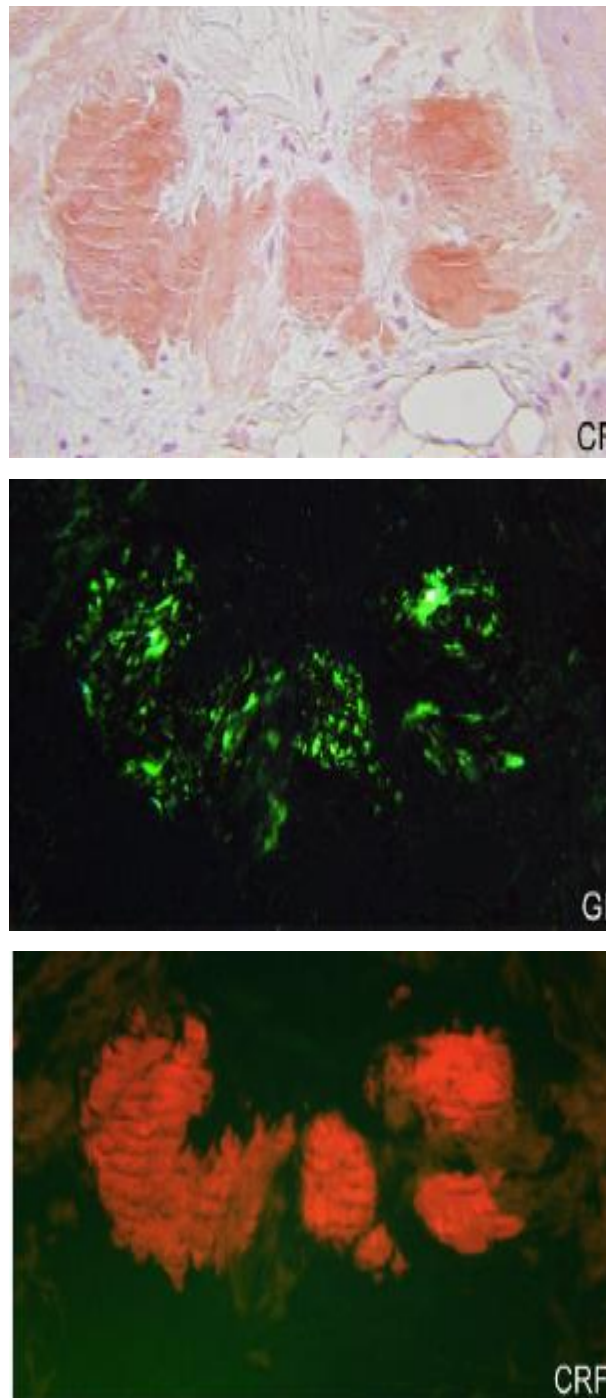


Рис. 1.11. Тканини амілоїду при спостереженні в світловий, поляризаційний та люмінесцентний мікроскопи [53].

Ще одним загальновизнаним щодо специфічності до β -агрегатів барвником є Тіофлавін Т (Рис. 1.12), що значно перевершує за чутливістю Конго червоний і ґрунтується на здатності до утворення високо специфічного флуорофора з β -складчастими білковими агрегатами. Варто зазначити, що в останні роки створено велику кількість молекулярних зондів, що значно

переважають цей барвник за квантовим виходом, що дає змогу визначати навіть окремі молекули [49].

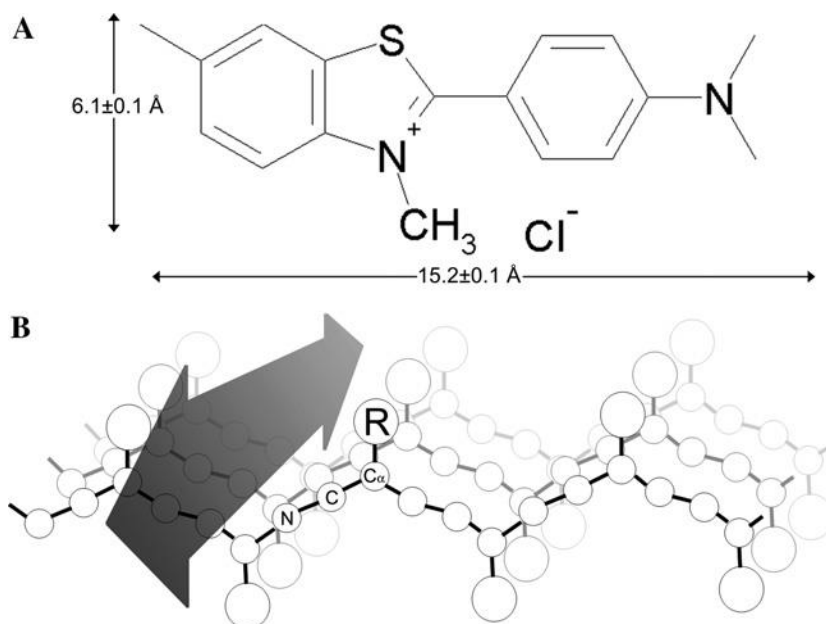


Рис. 1.12. Структурна формула барвника Тіофлавіну Т та схематичне зображення його розміщення на поверхні β-складчастого листка [54].

Істотна перевага люмінесцентної мікроскопії полягає в її здатності реєструвати флуорофори незалежно від їх розмірів, оскільки світлова та поляризаційна мікроскопія з застосуванням барвника Конго червоного видається неінформативною щодо виявлення малорозмірних молекулярних агрегатів. В той же час скупчення подібних утворень може бути виявлене за допомогою люмінесцентної мікроскопії. В наших попередніх дослідженнях при дослідженні тканин, профарбованих Конго червоним, в люмінесцентний мікроскоп МЛ-2 (ЛОМО, СРСР) спостерігали суцільну червону люмінесценцію досліджуваних тканин. Це свідчило про високу “засміченість” досліджуваних тканин β-структурованими білковими агрегатами, невидимими при застосуванні світлової та поляризаційної мікроскопії. Аналогічну картину спостерігали й при дослідженні профарбованих люмінесцентним барвником Тіофлавін Т препаратів назальних поліпів в люмінесцентний мікроскоп Olympus VX53P (Японія) за довжин хвиль збудження та випромінювання 450 та 482 нм (фільтр U-FBWW). Всі досліджувані препарати виявили характерну

для β -структурованих білкових агрегатів люмінесценцію (Рис. 1.13), що за розповсюдженістю в тканині значно перевершувала картину, отриману за допомогою світлової та поляризаційної мікроскопії.

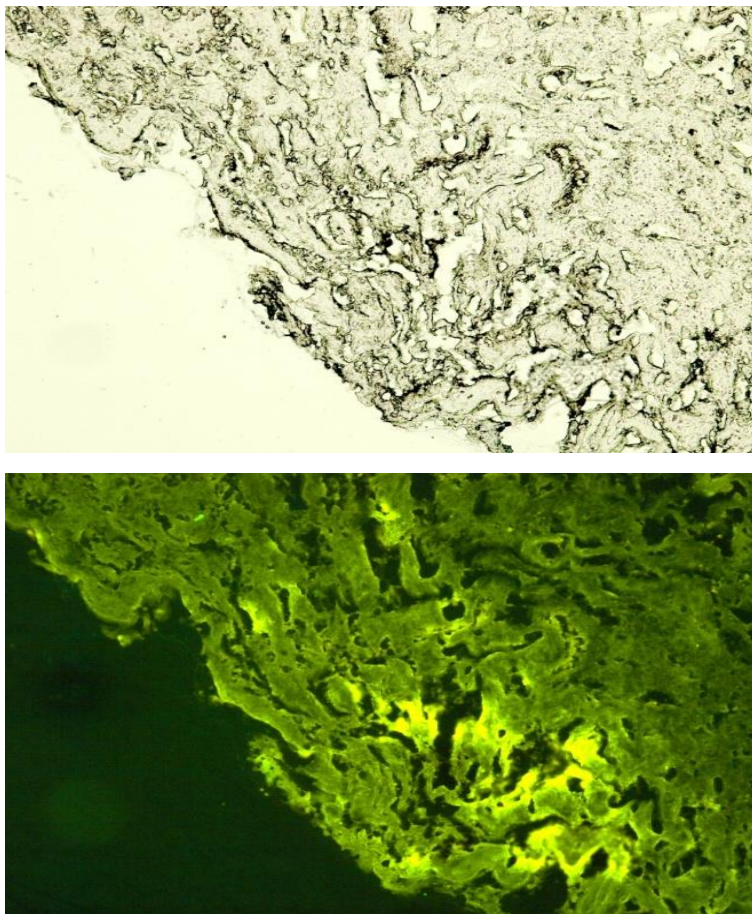


Рис. 1.13. Профарбований Тіофлавіном Т зразок досліджуваної тканини при спостереженні в світловий та люмінесцентний мікроскоп, X200.

Безпомилковість виявлення β -структурованих білкових агрегатів за допомогою Конго червоного з застосуванням оптичної та поляризаційної мікроскопії покладено в основу загальновизнаного методу виявлення амілоїдів. Однак утворення β -структурованих білкових агрегатів можливе й в інших аномальних тканинах, що утворились внаслідок порушення процесів обміну. До подібних утворень належать поліпи – розростання на слизовій оболонці найрізноманітнішої локалізації. Найбільш імовірною причиною їх утворення вважають локальні запальні процеси, що пов'язані з локальним накопиченням продуктів ендогенної інтоксикації [55-58]. Здатність подібних

включень до автохтонного росту та до локального порушення регуляції найрізноманітніших біологічних систем може бути причиною як розростання поліпів, та і їх післяопераційного рецидивування. Не меншої уваги заслуговує й сам агрегаційний процес, вартий моделювання та дослідження.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

В дослідженні в якості об'єкта для моделювання процесів агрегації білків використовували яєчний лізоцим (Sigma-Aldrich, США) та сироватковий альбумін людини (Reanal, Угорщина).

2.2. Обладнання та реактиви, що були використані в дослідженні

Під час проведення дослідження використовували такі реактиви:

- буфер з рН 2,0, приготований за методикою Кларка-Лабса;
- К, Na-фосфатний буфер, рН 7,6;
- 0,3 М натрій-форміатний буфер, рН 7,8;
- 0,9% розчин хлориду натрію;
- 0,2 % розчин азиду натрію;
- 2 Н розчин гідроксиду натрію;
- 2 Н розчин соляної кислоти;
- розчин сульфату нікелю NiSO_4 з концентраціями 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM та 0,0001 mM;
- 0,1% розчину барвника Конго червоний;
- 0,05% розчин барвника Конго червоний.

Також проведення дослідження вимагало роботу з таким обладнанням:

- Сухожарова шафа, 53 л, природна конвекція, до 300 ° С, нержавіюча сталь, SingleDISPLAY (Mettler, Німеччина);
- рН-метр MP 512 (Ulab HLR, Україна);
- ІЧ-Фур'є спектрометр IRTracer-100 (Shimadzu, Японія);
- мікроскоп Olympus BX53P (Olympus, Японія).

2.3. Методика дослідження агрегаційних властивостей білків.

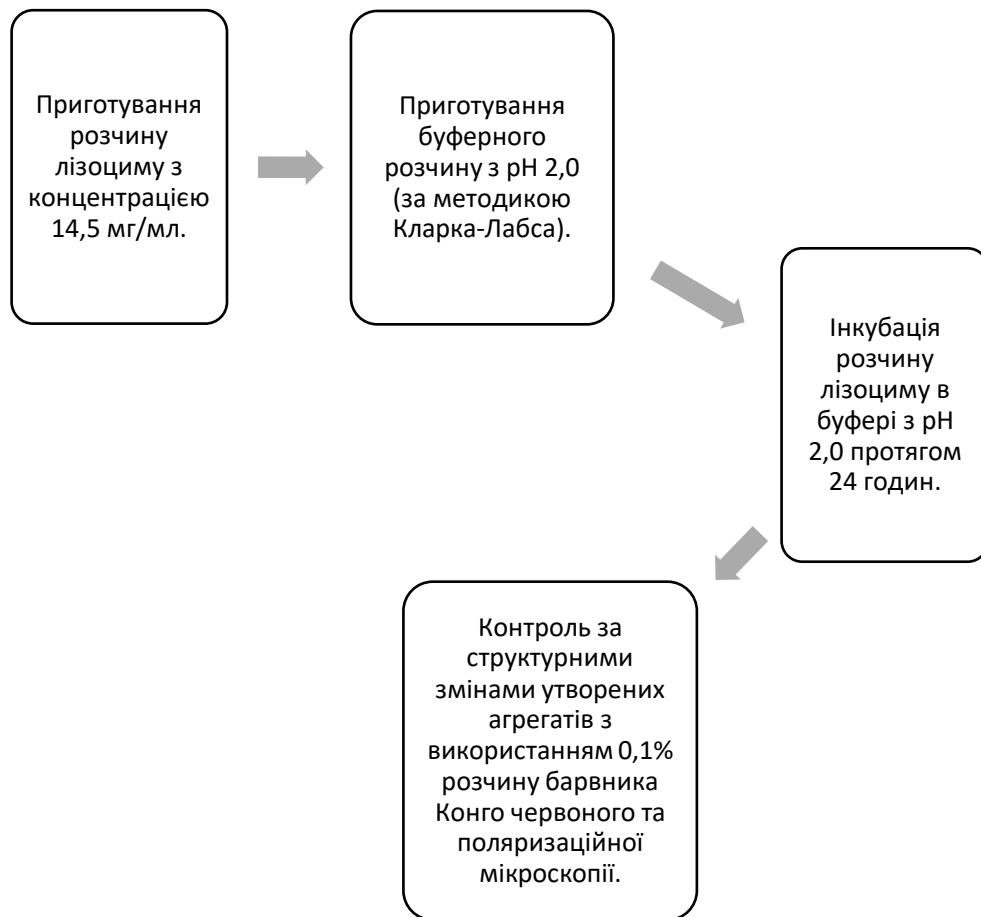


Рис. 2.1. Схема моделювання агрегаційного процесу в білкових розчинах на прикладі лізоциму.

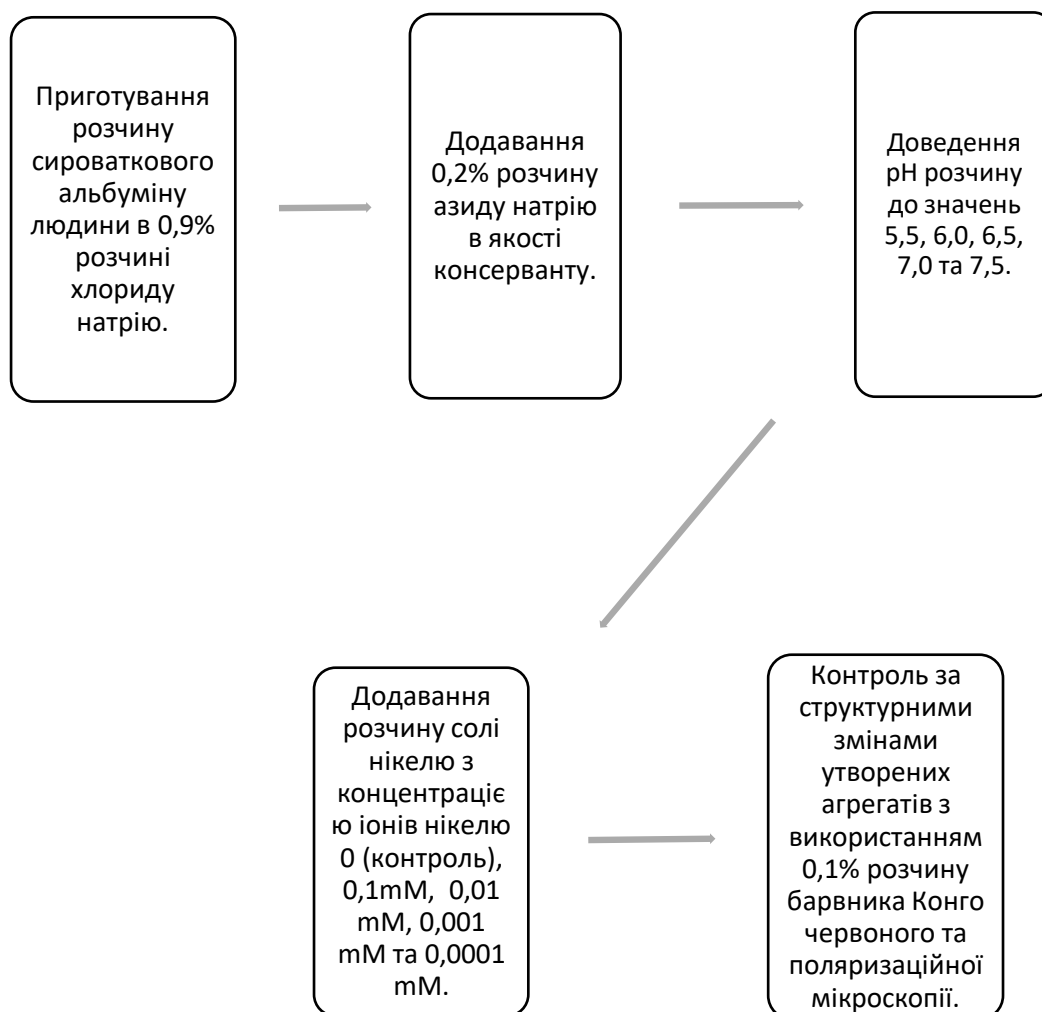


Рис. 2.2. Схема моделювання агрегаційного процесу в білкових розчинах на прикладі сироваткового альбуміну людини з додаванням нікелю.

2.3.1. Моделювання агрегаційних процесів в білкових розчинах.

Для моделювання агрегаційного процесу в білкових розчинах застосовували кислий буфер рН 2,0, приготований за методикою Кларка-Лабса: 25 мл 0,2 М розчину КСІ, 6,5 мл НСІ на 100 мл розчину (Рис. 2.3.).

25 мл 0,2 М КСl, х мл НСl на 100 мл розчину			50 мл 0,1 М бифталата каля, х мл 0,1 М НСl на 100 мл розчину			25 мл 0,2 М КСl, х мл НСl на 100 мл розчину			50 мл 0,1 М бифталата каля, х мл 0,1 М НСl на 100 мл розчину		
рН	х	Буферная емкость β	рН	х	Буферная емкость β	рН	х	Буферная емкость β	рН	х	Буферная емкость β
1,00	67,0	0,31	2,20	49,5	—	1,70	13,0	0,060	3,20	15,7	0,030
1,10	52,8	0,42	2,30	45,8	0,036	1,80	10,2	0,049	3,30	12,9	0,026
1,20	42,5	0,19	2,40	42,2	0,035	1,90	8,1	0,037	3,40	10,4	0,023
1,30	33,6	0,16	2,50	38,8	0,034	2,00	6,5	0,030	3,50	8,2	0,020
1,40	26,6	0,13	2,60	35,4	0,033	2,10	5,1	0,026	3,60	6,3	0,018
1,50	20,7	0,10	2,70	32,1	0,032	2,20	3,9	0,022	3,70	4,5	0,017
1,60	16,2	0,077	2,80	28,9	0,032				3,80	2,9	0,015
			2,90	25,7	0,033				3,90	1,4	0,014
			3,00	22,3	0,034				4,00	0,1	0,014
			3,10	18,8	0,033						

Рис. 2.3. Склад та рН буферних розчинів за Кларком та Лабсом [59].

Формування сферолітів проводили інкубуючи 1 мМ (14,5 мг/мл) розчин лізоциму у кислому буфері з рН 2,0 протягом доби при 65°C.

З метою дослідження конформаційних переходів використовували розчин сироваткового альбуміну людини в 0,9% розчині хлориду натрію. В якості консерванта додавали 0,2 % азид натрію. Вихідне значення рН такого розчину – 6,62. За допомогою 2 Н розчину гідроксиду натрію та 2 Н розчину соляної кислоти рН розчину доводили до значень 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 та 7,5 з відбором аліквот, необхідних для подальших дослідів. До окремих аліквот для кожного зі значень рН додавали розчин сульфату нікелю (NiSO_4) в кількостях, що при доведенні розчину до кінцевого об'єму 5,0 мл забезпечувало концентрації іонів нікелю 0 мМ (контроль), 0,1 мМ, 0,01 мМ, 0,001 мМ та 0,0001 мМ. Тим самим створювали сітку діапазонів рН та концентрацій іонів нікелю за схемою:

рН 5,5 [Ni ²⁺] 0 мМ	рН 6,0 [Ni ²⁺] 0 мМ	рН 6,5 [Ni ²⁺] 0 мМ	рН 7,0 [Ni ²⁺] 0 мМ	рН 7,5 [Ni ²⁺] 0 мМ
рН 5,5 [Ni ²⁺] 0,1 мМ	рН 6,0 [Ni ²⁺] 0,1 мМ	рН 6,5 [Ni ²⁺] 0,1 мМ	рН 7,0 [Ni ²⁺] 0,1 мМ	рН 7,5 [Ni ²⁺] 0,1 мМ
рН 5,5 [Ni ²⁺] 0,01 мМ	рН 6,0 [Ni ²⁺] 0,01 мМ	рН 6,5 [Ni ²⁺] 0,01 мМ	рН 7,0 [Ni ²⁺] 0,01 мМ	рН 7,5 [Ni ²⁺] 0,01 мМ
рН 5,5 [Ni ²⁺] 0,001 мМ	рН 6,0 [Ni ²⁺] 0,001 мМ	рН 6,5 [Ni ²⁺] 0,001 мМ	рН 7,0 [Ni ²⁺] 0,001 мМ	рН 7,5 [Ni ²⁺] 0,001 мМ
рН 5,5 [Ni ²⁺] 0,0001 мМ	рН 6,0 [Ni ²⁺] 0,0001 мМ	рН 6,5 [Ni ²⁺] 0,0001 мМ	рН 7,0 [Ni ²⁺] 0,0001 мМ	рН 7,5 [Ni ²⁺] 0,0001 мМ

Кожен зі зразків герметично закривали гумовим корком та вміщували до сухого повітряного термостату.

Контроль за структурними змінами білків та оцінку структури утворених агрегатів проводили наступним чином: утворені білкові агрегати досліджували, змішуючи на предметному склі краплини суспензії агрегованих білків з рівним об'ємом 1% розчину барвника Конго червоного з подальшим мікроскопічним дослідженням в світловому та поляризаційному режимах. Специфічний барвник Конго червоний зв'язується з агрегованими білками за участі гідрофобних взаємодій між бензидиновими центрами та електростатичних взаємодій сульфатними групами та амінокислотними залишками (гістидин А β -білка) [60].

2.3.2. Мікроскопічні та ІЧ-спектроскопічні дослідження утворених агрегатів.

Мікроскопічні дослідження проводили за допомогою мікроскопу Olympus VX53P (Японія) в світловому та поляризаційному режимах. Olympus VX53P - поляризаційний дослідницький мікроскоп. Цей мікроскоп підходить для якісної і кількісної поляризації. При цьому, об'єктами дослідження можуть бути як живі мікроорганізми та макромолекули, так і кристали. Комплектуватися мікроскоп може більш ніж дев'ятьма різними аналізаторами і λ пластинами [61].

Отримувані в ході мікроскопічного дослідження зображення переводили в оцифрований вигляд за допомогою вбудованого документатора.



Рис. 2.4. Мікроскоп Olympus BX53P (Японія), за допомогою якого проводили дослідження утворених агрегатів в світловому та поляризаційному режимах.

Для перевірки агрегатного стану утворених білкових осадів, спільно зі співробітниками відділу фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України під керівництвом доктора фізико-математичних наук Довбешко Г. І., було проведено спектроскопічне дослідження змодельованих білкових систем. Відомо, що антипаралельні β -складчасті структури в інфрачервоному діапазоні мають характерне поглинання в зоні 1610-1630 $1/\text{см}$ [62].

ІЧ-спектри більшою мірою чутливі до змін в β -структурі тому, що α -спіралі і неупорядковані структури мають близькі довжини хвиль в області ІЧ спектру - 1650-1655 $1/\text{см}$, і 1645-1652 $1/\text{см}$ відповідно, тому їх буває важко

дискримінувати. У той час як з β -структурою такої проблеми немає - вона має два основних характерних піки (інтервали хвильових чисел 1628-1635 $1/\text{см}$ і 1680-1690 $1/\text{см}$).

В ІЧ-спектрах білків можна спостерігати два характерних піки в області 1620-1624 і 1690-1696 $1/\text{см}$, що відповідають антипаралельним β -шарам і які досить віддалені від піків паралельних β -шарів і від інших елементів вторинної структури. При агрегації білків найчастіше спостерігається екстенсивне утворення додаткових антипаралельних β -шарів [63].

В останні роки дедалі більшої уваги дослідників зазнають роботи, присвячені з'ясуванню процесів утворення β -структурованих білкових агрегатів – характерних для різноманітних захворювань аномальних включень в тканинах. Імуногенність, висока стійкість до протеолізу та здатність до автохтонного розростання за рахунок сорбції та перебудови розчинних білків надає подібним включенням комплекс властивостей, що за тяжкістю впливу на організм перевищує вихідні метаболічні порушення. Тому моделювання процесів, що опосередковують агрегаційні процеси, належать до провідних напрямків сучасної біохімії.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Моделювання процесу утворення β -структурованих білкових агрегатів за умов *in vitro*

Для моделювання процесів агрегації до 1 мл аліквот розчинів альбуміну людини та яєчного лізоциму додавали по 1 мл кислого буферу рН 2,0 та інкубували протягом 48 годин при температурі 60°C. Після виявлення помутніння, зумовленого утворенням нерозчинних білкових агрегатів, відбирали 1.0 мл аліквоту суспензії, до якої додавали рівний об'єм 0.3 М натрій-форміатного буферу, рН 7,8 та 2,0 мл 0,1 % розчину Конго червоного. Як забарвлені, так і незабарвлені проби досліджували в світловому та поляризаційному мікроскопах.

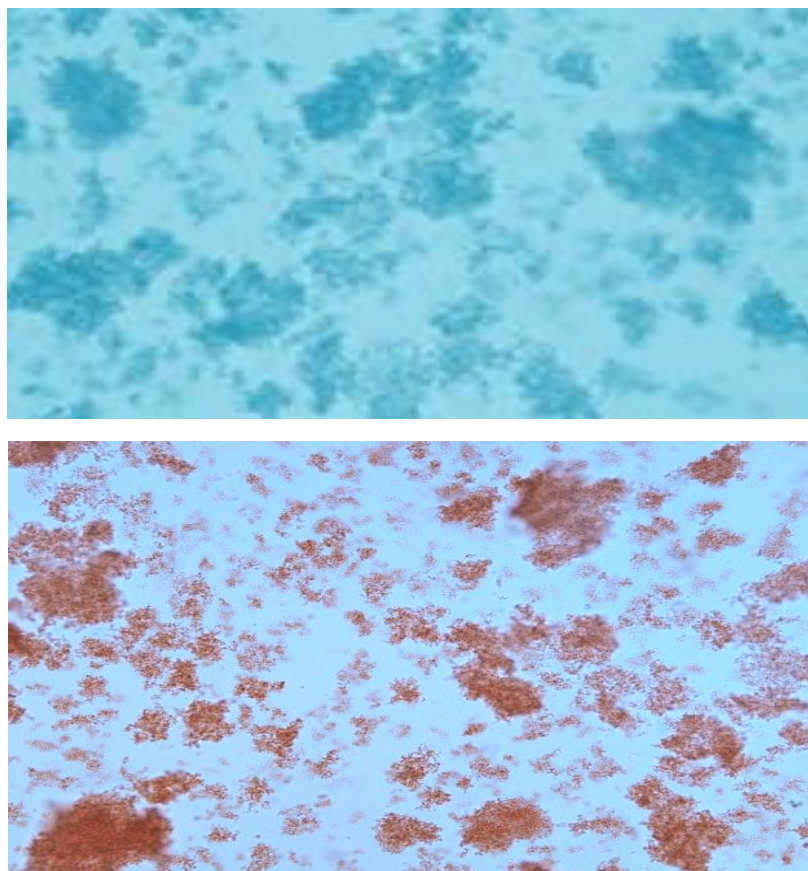


Рис. 3.1. Типова картина агрегатів досліджуваних білків без забарвлення та після забарвлення Конго червоним. X200.

В обох випадках спостерігали утворення агрегованих утворень, що сорбували барвник Конго червоний, однак жоден з досліджуваних зразків як в нефарбованому, так і в фарбованому стані оптичної активності не виявляв. Це свідчить про утворення нерегулярних агрегатів, що здатні сорбувати барвник, однак не виявляють вираженої оптичної анізотропії. Тому можна вважати доведеним, що застосований режим агрегації не забезпечує отримання β -структурованих агрегатів.

При проведенні агрегаційного процесу за методом утворення сферолітів, отримано якісно відмінні результати. Утворені сироватковим альбуміном людини агрегати хоч і сорбували Конго червоний, однак оптичної активності не спостерігалось. Натомість в розчинах яєчного лізоциму протягом перших 8 годин агрегації виявлено поодинокі сфероліти, що виявляли оптичну активність та давали типову картину “мальтійського хреста” (Рис. 3.2).

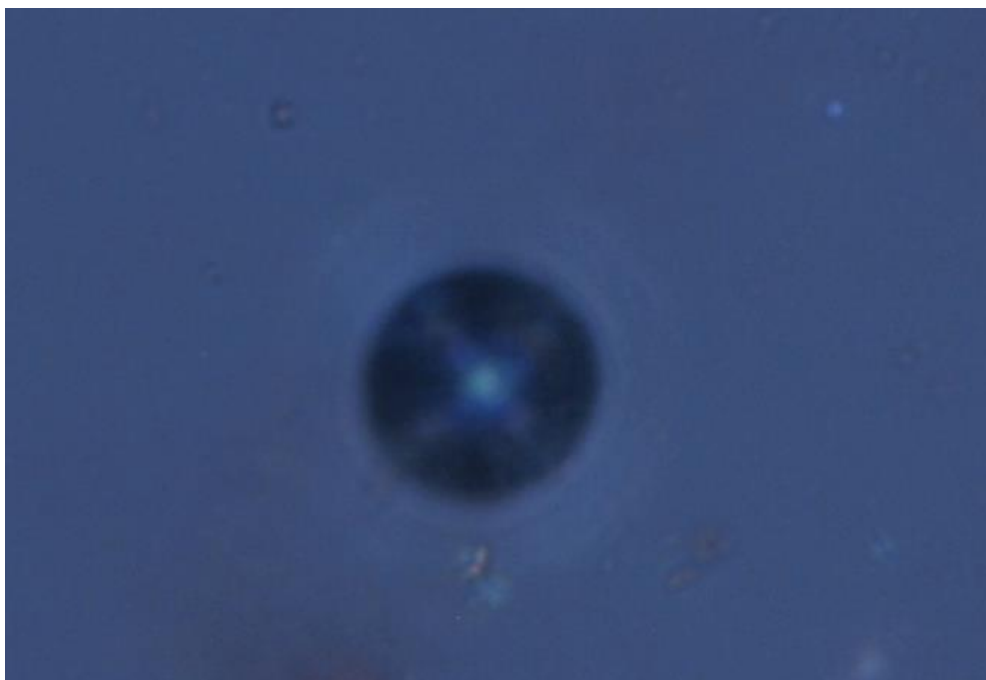


Рис. 3.2. Типовий сфероліт - волокнисто-радіальна форма відкладення β -фібрилярного білкового агрегату – при спостереженні в поляризаційний мікроскоп з характерною картиною “мальтійського хреста”, X200.

При подальшому розвитку агрегаційного процесу утворювались нерегулярні агрегати, що виявляли оптичну активність (Рис. 3.3).

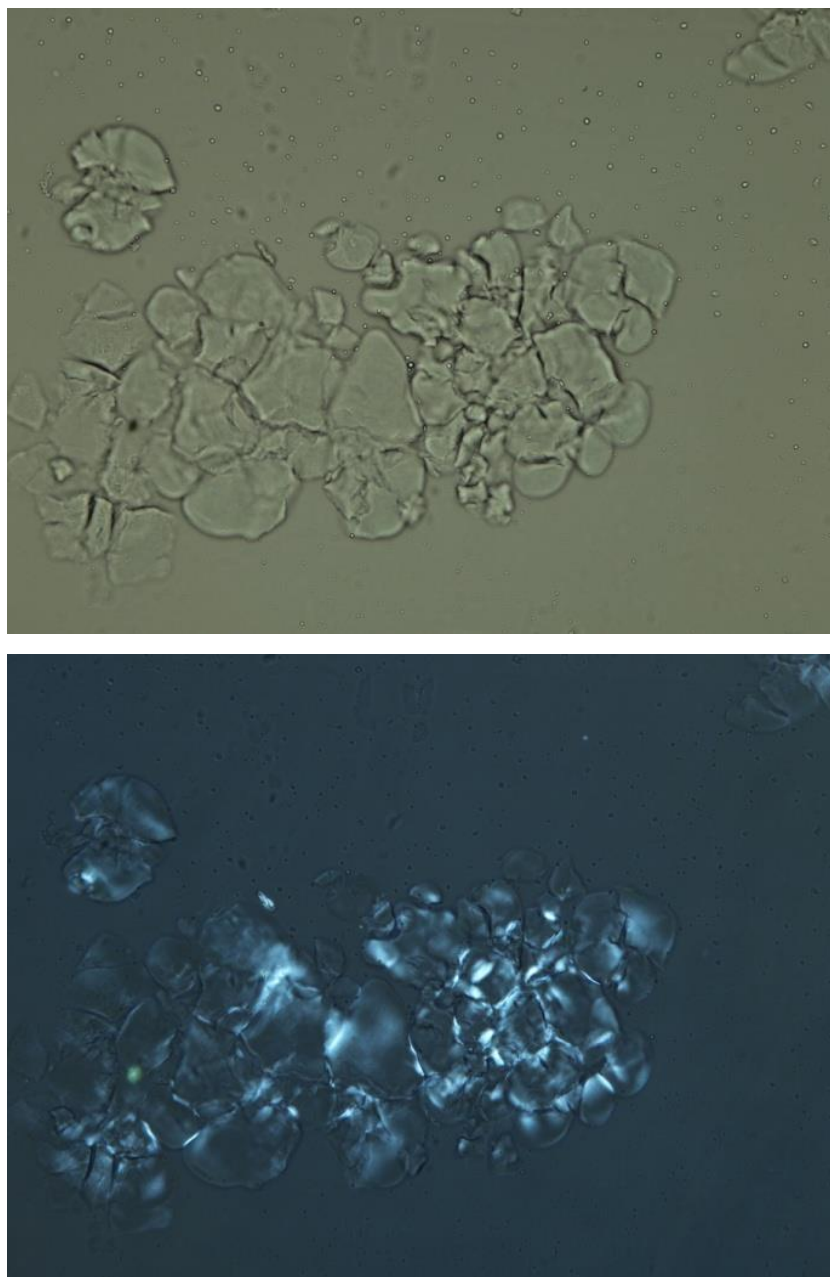


Рис. 3.3. Агрегати яєчного лізоциму при спостереженні в світловий (зліва) та поляризаційний (справа) мікроскоп, x200.

Остання властивість свідчить про присутність в структурі досліджуваних агрегатів оптично активних β -структурованих включень. Ці ж агрегати після переведення розчинів до нейтральних значень рН та забарвлення Конго

червоним не лише інтенсивно сорбували барвник, але й виявили яскраво виражену оптичну анізотропію (Рис. 3.4).

Порушення гідратної оболонки, зокрема – під впливом зміни рН, іонної сили та температури, призводить до агрегації білка. Через різке зниження рівня вільної енергії подібна агрегація носить незворотний характер. Проте, винятком з цього правила є білок Бенс-Джонса – утворена легкими ланцюгами імуноглобулінів домішка, що відсутня в сечі здорових людей, але з'являється при мієломній хворобі, а також при макроглобуланемії Вальденстрема, плазмоцитомі, первинному амілоїдозі, хронічному лімфолейкозі, ендотеліозі, парапротеїнемічному гемобластозі та лімфогранулематозі. При обмеженому підкисленні зразка сечі (рН 4,5) та нагріванні до 65^oC відбувається випадіння цього білка в осад, що при охолодженні знову розчиняється. Подібна властивість може бути наслідком перебування білка в складі супрамолекулярного агрегату, чия вільна енергія мало відрізняється від видимих агрегованих форм. Відновлення гідратної оболонки при охолодженні може бути причиною розчинення білкового осаду.

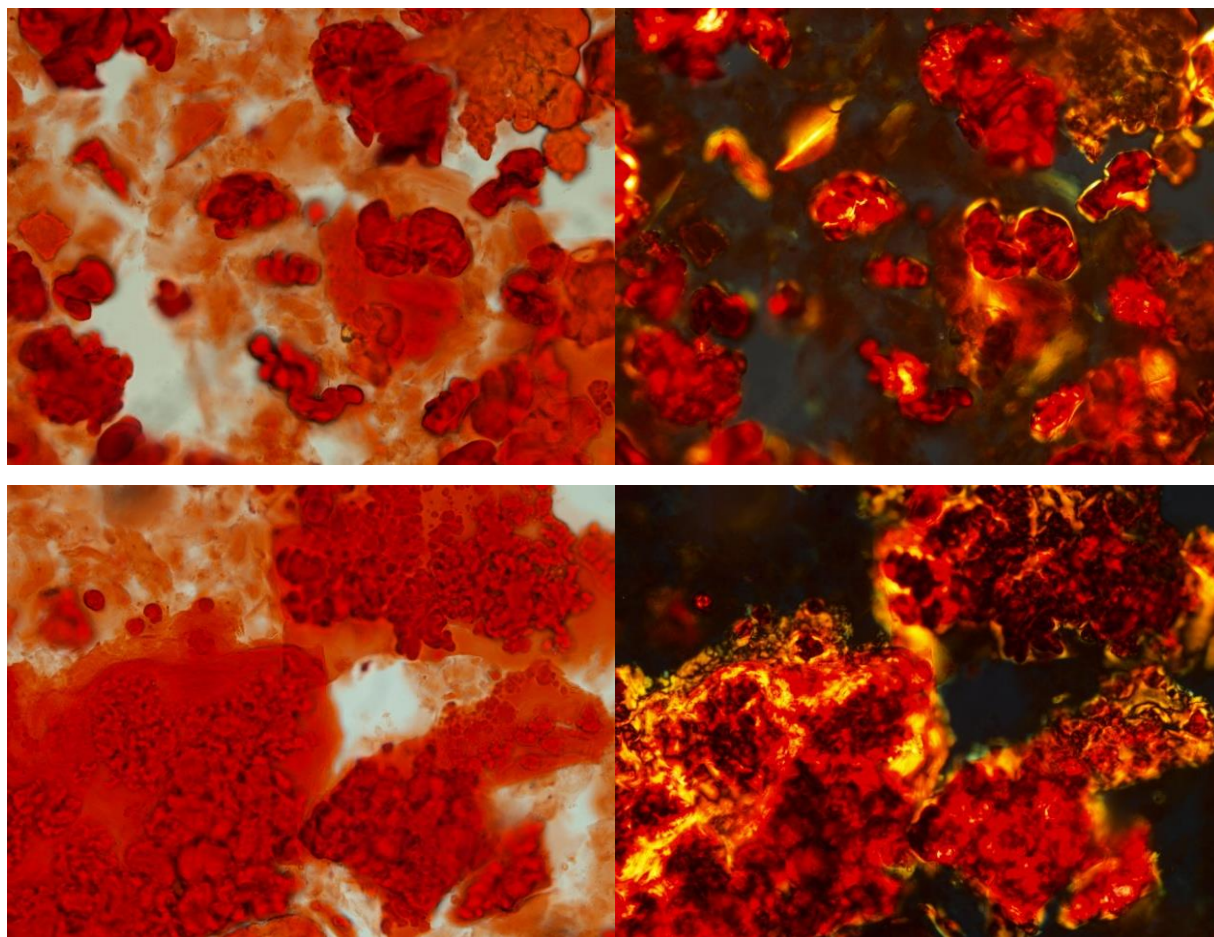


Рис. 3.4. Агрегати яєчного лізоциму після забарвлення Конго червоним при спостереженні в світловий (ліворуч) та поляризаційний (праворуч) мікроскоп, $\times 200$.

Як видно на рис. 3.4, при спостереженні в поляризаційний мікроскоп, спільно з домінуючим червоним забарвленням, спостерігаються включення зеленого. Це свідчить про утворення оптично активних хромофорів барвника з β -структурованими ділянками білкових агрегатів. Водночас переважне забарвлення в червоний колір може бути наслідком відомого з літератури утворення β -структурованих угруповань, чий розмір перевищує нижню межу обмеження Аббе ($0,61 \lambda$), однак не сягають розмірів, необхідних для регулярного відхилення поляризованого світла [64,65]. Дослідження подібних супрамолекулярних об'єктів проводяться в провідних лабораторіях світу для з'ясування молекулярних основ пов'язаних з агрегацією білків захворювань.

Все це дає змогу зробити певні узагальнення щодо динаміки перебігу агрегаційного процесу. На ранніх стадіях відбувається формування досить обмеженої кількості зародків агрегації – нуклеусів, що стають свого роду стартовими матрицями агрегаційного процесу.

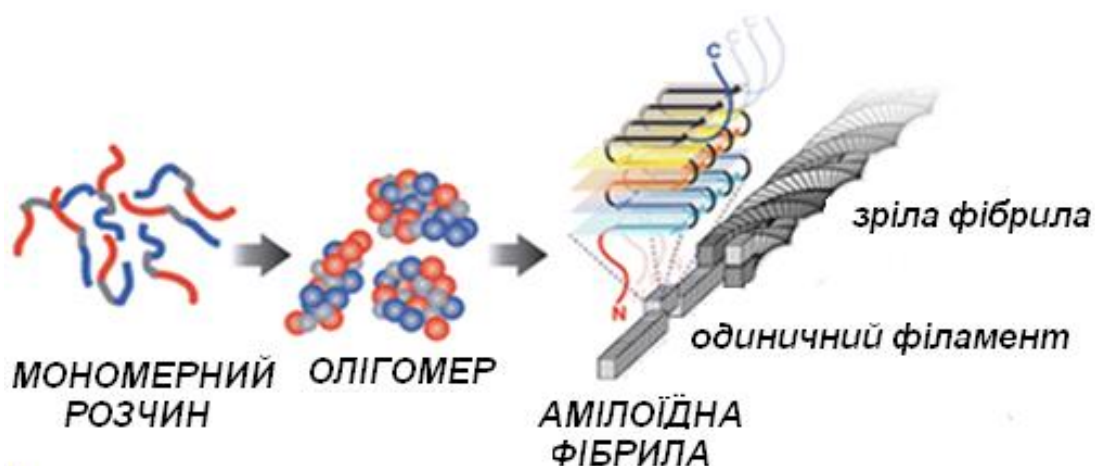


Рис. 3.5. Стадії формування β -структурованих білкових фібрил [66]

Конформаційна нестабільність характерна для всіх схильних до агрегації білків і пептидів. Патогенна форма білка може утворитися через перехідний стан, що існує між повністю розгорнутою і нативною формами поліпептидного ланцюга, оскільки енергія активації, необхідна для переходу з проміжного стану в схильну до агрегації форму, не набагато перевищує енергію, необхідну для переходу в нативну форму. При цьому сукупна форма енергетично більш вигідна. Відповідно до альтернативної моделі, розгорнутий поліпептидний ланцюг може укладатися в дві різні проміжні форми. З однієї формується нативний білок в нормальній конформації, з другої - схильна до агрегації форма. Таким чином, білки, здатні утворювати альтернативні, проте більш схильні до агрегації структури, що володіють подібними термодинамічними характеристиками.

Сорбуючи розчинні білки та перебудовуючи їх структуру за своєю подобою, подібні утворення через стадію формування сферолітів перетворюються на досить великі за розмірами агрегати. Тобто в розглянутому випадку швидкість другої стадії перебудови білкових молекул

явено перевершує початкову стадію формування нуклеусів. Однак якщо з тих чи інших причин швидкість другої стадії агрегації порівняна або поступається першій, то наслідком подібної динаміки агрегаційного процесу має бути утворення величезної кількості супрамолекулярних агрегатів. Водночас векторний характер утворення фібрил призводить до парадоксального гальмування відносної швидкості росту окремих угруповань і, як наслідок, приблизну рівність їх між собою. Подібні утворення матимуть повний комплекс властивостей наночасток, що не лише робитиме їх невидимими в оптичному діапазоні світла, але й убезпечуватиме від агрегації. Подібні композиції набули назви нанорідин та зазнають інтенсивного дослідження в провідних наукових центрах світу.

3.2. Вплив нікелю на процес утворення β -структурованих білкових агрегатів

З метою дослідження впливу значень рН та концентрації іонів нікелю на агрегатний стан сироваткового альбуміну, отримані зразки піддавали термостатуванню зі ступінчастим збільшенням температури. Інтервали інкубації становили 72 години.

Трьохдобова інкубація при 37⁰С не призвела до будь-яких видимих змін досліджуваних розчинів. При збільшенні температури інкубації до 50⁰С також не спостерігалось будь-яких змін. Інкубація ж протягом трьох діб при 60⁰С призвела до утворення осаду в усіх нікель-вміщуючих зразках за рН 5,5, тоді як контрольний зразок лишався розчиненим (Рис. 3.6).

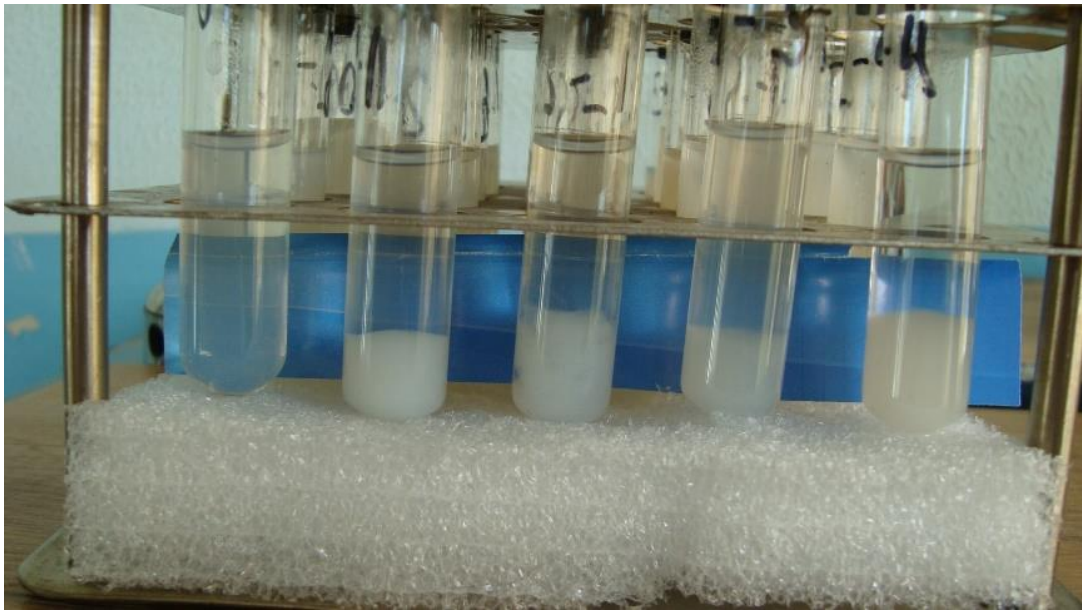


Рис. 3.6. Температурно індукована агрегація білка при рН 5,5. Зліва направо – безнікелевий контроль, концентрації іонів нікеля 0,1, 0,01, 0,001 та 0,0001 мМ.

Отриману лінію рН 5,5 виводили з досліджу, інші ж препарати продовжували піддавати ступінчатій інкубації зі зростанням температури. Внаслідок інкубації при 65⁰ С сформувався осад у зразку з рН 7,0/[Ni²⁺] 0,01 мМ, а внаслідок 72-годинної інкубації при 70⁰ С агрегували всі, включаючи позбавлені нікелю контрольні.

Суспензію отриманих осадів переносили на предметне скельце та досліджували в світловому та поляризаційному режимі за допомогою мікроскопа Olympus VX53P при збільшенні x200.

У світловому режимі всі без винятку осад являли собою драглисті утворення білого кольору (Рис. 3.7, зверху), тоді як у поляризаційному режимі в них визначено значні кількості включень, що виявляють оптичну активність (Рис. 3.7, знизу).

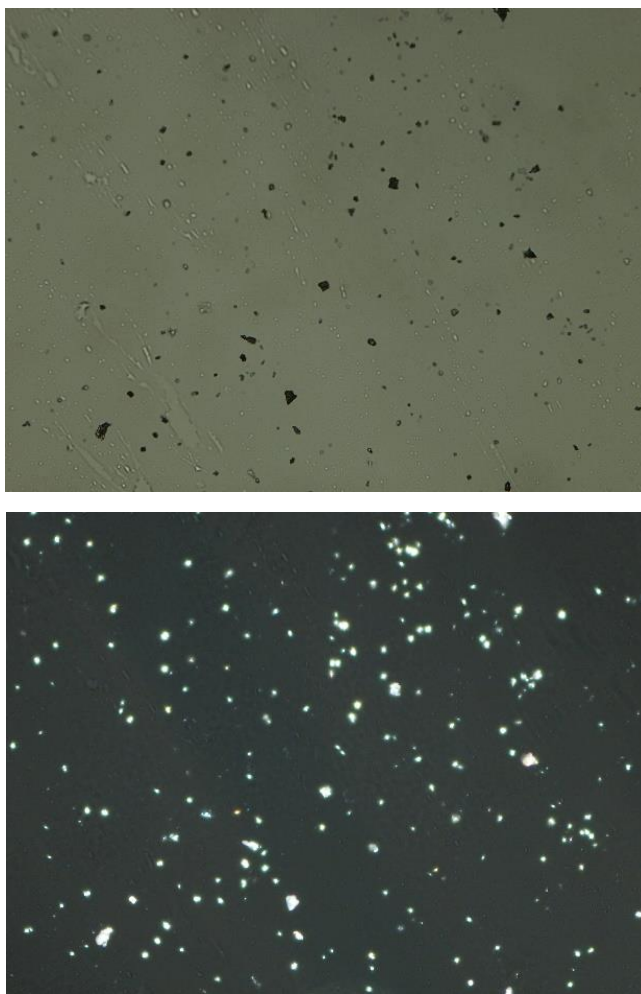


Рис. 3.7. Зразок рН 5,5/[Ni²⁺] 0,001 мМ в світловому (зверху) та поляризаційному (знизу) мікроскопі, x200.

До 0,2 мл суспензії агрегованого білка додавали 0,4 мл 0,05 % розчину Конго червоний в К, Na-фосфатному буфері рН 7,6. Тим самим забезпечували рН сумарного розчину, що не доходив для критичного для Конго червоного значення індикаторного переходу рН 5,2 та не утворюється сіро-синій хромофор, характерний для цього барвника в розчинах слабких кислот. Всі без винятку агреговані білки сорбували барвник та профарбовувались в червоний колір, тоді як виведений з режиму інкубації не вміщуючий нікелю контрольний зразок рН 5,5 лишався розчинним (Рис. 3.8).

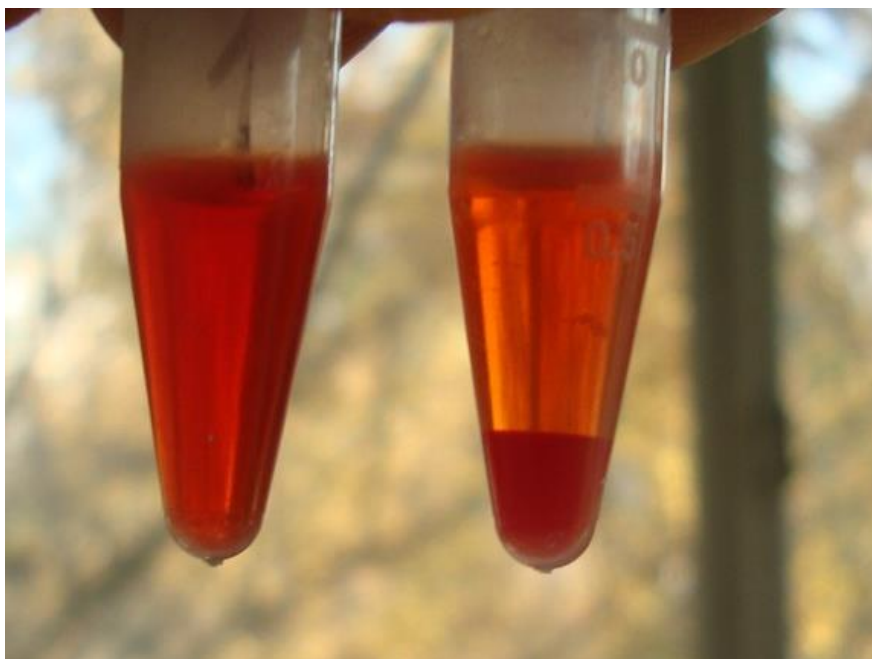


Рис. 3.8. Сорбція білковими агрегатами специфічного барвника Конго червоного (праворуч – зразок, що вміщує нікель, ліворуч - виведений з режиму інкубації не вміщуючий нікелю контрольний зразок).

Суспензію профарбованих Конго червоним осадів досліджували за допомогою мікроскопа Olympus VX53P в світловому та поляризаційному режимах. В світловому режимі всі без винятку зразки являли собою драглисті структури червоного кольору. При переході в режим поляризаційної мікроскопії виявлено числені включення яблучно-зеленого кольору, що свідчить про наявність в складі осаду регулярних β -структурованих утворень (Рис. 3.9).

Конго червоний є дуже чутливим до рН оточення, а саме, його зв'язування з β -структурованими білковими депозитами відбувається лише за низьких значень рН. На поверні білкового агрегату барвник сорбується паралельно до осі фібрили, кожна молекула барвника у жолобку зв'язується з шістьма β -ланцюгами [50]. Така орієнтація барвника Конго червоного пояснює виникнення ефекту подвійного променезаломлення при зв'язуванні з фібрилярними агрегатами [67]. Таким чином, β -структуровані білкові депозити, пофарбовані Конго червоним, зазвичай, мають зелене подвійне

заломлення променів у поляризованому світлі. Проте можлива і сорбція без утворення оптично активного хромофору.

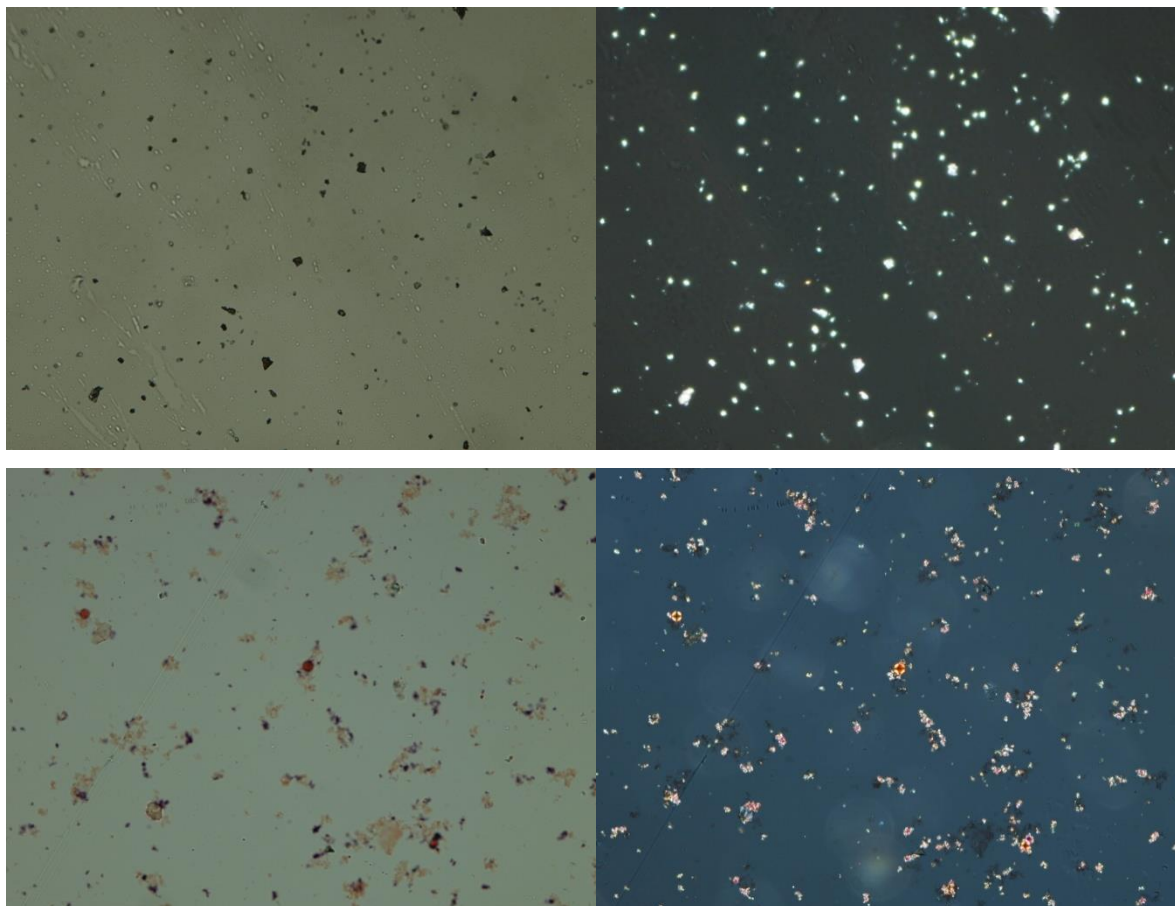


Рис. 3.9. Типові зразки профарбованих Конго червоним препаратів агрегованого білка в світловому (ліворуч) та поляризаційному (праворуч) мікроскопі, x200.

Як випливає з даних, наведених на рис. 3.10, характерне «плече» β -структур виявлене лише в нікель-вміщуючих зразках при рН 5,5, в той час як за відсутності йонів нікелю агрегація має хаотичний характер, а саме у зразку, який не містить нікелю, характерна смуга антипаралельної β -структури білку (1615 – 1630 $1/\text{cm}$) майже відсутня.

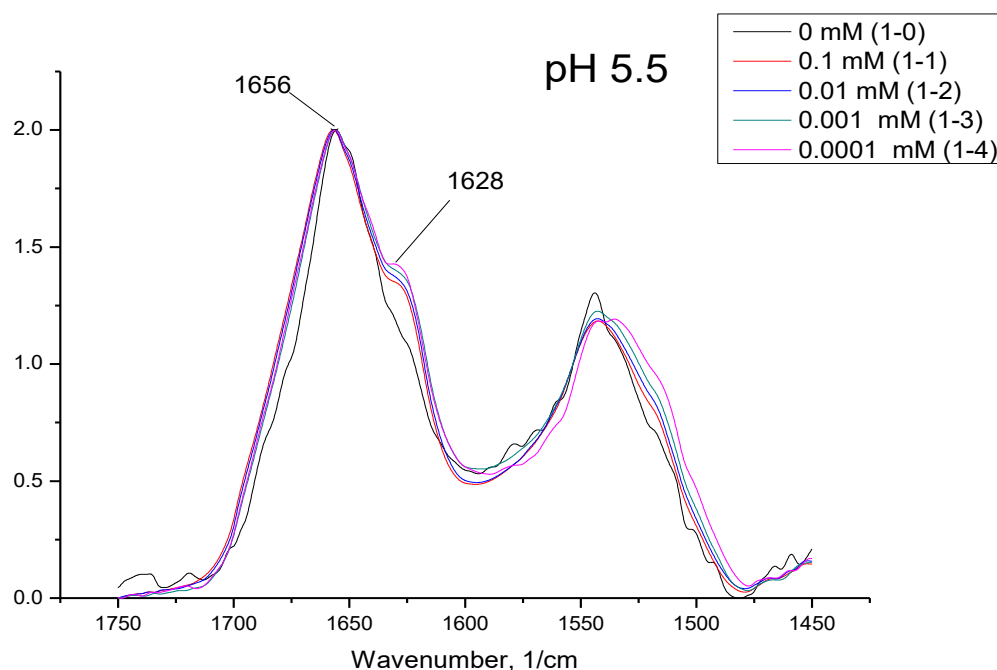


Рис. 3.10. ІЧ-спектроскопічне дослідження білкових систем за різних концентрацій нікелю при рН 5,5 (графік побудовано за допомогою OriginLab).

Для порівняння, на рис. 3.11 можна побачити ІЧ-спектроскопічне зображення сироваткового альбуміну людини без додавання будь-яких агрегаційних агентів, на якому видно, що характерними для нативного білка піками є піки за довжин хвиль 1654 та 1542 $1/\text{см}$, в той час як при додаванні нікелю спостерігається утворення додаткового піку, так званого «плеча», за довжини хвилі 1628 $1/\text{см}$ (див. рис. 3.10).

З цього можна зробити висновок, що найбільш виражена структуроутворююча роль нікелю виявлена при рН 5,5, а за інших значень рН цей ефект спостерігався в значно меншому ступені.

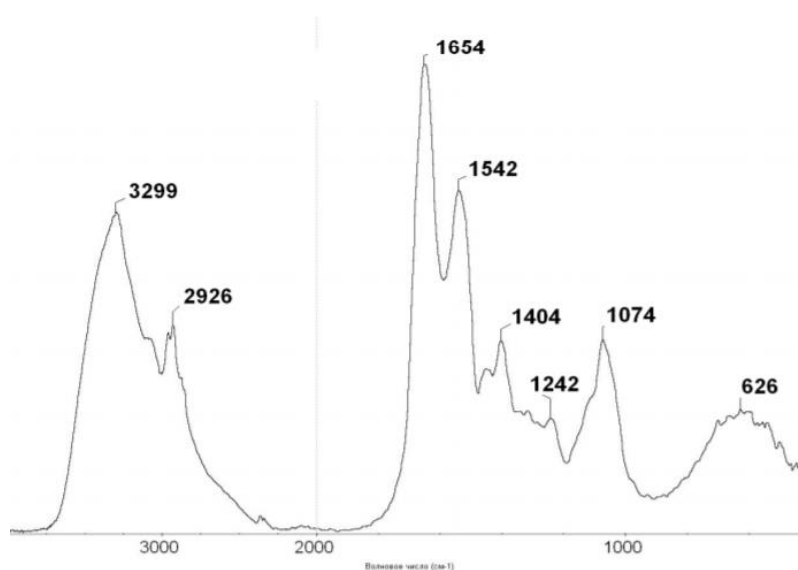


Рис. 3.11. ІЧ-спектроскопічне зображення сироваткового альбуміну людини [68].

Тим самим показано можливість конформаційного переходу розчинного α -структурованого сироваткового альбуміну людини в агрегований стан за включеннями β -структурованих утворень. Показано перебіг цього процесу під впливом кількох денатуруючих факторів – рН, температури та іонів нікелю. Показано, що іони нікелю виявляють денатураційні властивості, що найбільш виражені за значення рН 5,5 – як найбільш наближеного до ізоелектричної точки сироваткового альбуміну 4,9. При цьому за 60⁰ С агрегація відбувається лише в нікель-вміщуючих зразках, тоді як контрольний зразок, а також зразки всіх інших досліджуваних груп виявляли агрегаційні властивості при 70⁰ С, тобто за істотно більшої температури. Тим самим нами відпрацьовано режими формування β -структурованих агрегатів, що можуть бути застосовані в якості стартової матриці при подальших дослідженнях агрегаційних процесів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Отримані результати дають змогу зробити наступні висновки та узагальнення.

Проведено моделювання процесів утворення β -структурованих білкових агрегатів та на прикладі яєчного лізоциму та альбуміну людини показано залежність характеру агрегації білка від його амінокислотного складу. Методами оптичної та поляризаційної мікроскопії досліджено структуру утворених агрегатів. У випадку яєчного лізоциму показано первинне утворення поодиноких сферолітів з переходом до формування оптично активних агрегатів, що специфічно взаємодіють з барвником Конго червоним, при цьому їх оптична активність різко зростає.

При порівнянні агрегаційних властивостей яєчного лізоциму та альбуміну людини показано залежність схильності білка до агрегації від його амінокислотного складу. Тобто експериментально доведено як можливість отримання β -структурованих білкових агрегатів в штучних умовах, обговорено причини та механізми регулярної агрегації білків. В ході дослідження на прикладі яєчного лізоциму успішно проведено моделювання процесу формування β -структурованих білкових агрегатів, що становлять основу чи істотне ускладнення великої кількості хвороб.

Також було проведено дослідження денатураційного впливу на сироватковий альбумін людини факторів рН, температури та концентрації іонів нікелю. Показано, що агрегаційний процес супроводжується конформаційним переходом “ α -спіраль – β -укладка” з утворенням значних за розміром і тому видимих в оптичний мікроскоп β -структурованих фібрил. Це добре узгоджується з відомими даними щодо енергетичної вигідності подібного переходу.

Доведено здатність іонів нікелю обумовлювати процес агрегації білка навіть за найменшого з досліджуваних в нашій роботі значень концентрації іонів нікелю 0,0001 mM, тобто 10^{-7} M. Подібна здатність пояснює причини

контактного дерматиту, обумовленого контактом з предметами з нікель-вміщуючих сплавів та з нікельованим покриттям.

Істотне порушення структури білкової молекули призводить не лише до втрати нею своїх біологічних властивостей, але й до розпізнавання її як “чужої” для даного організму з подальшим вилученням та деградацією захисними системами. Відомо, що іони нікелю здатні до утворення комплексних координаційних сполук, зокрема – з аміаком та амінами. Це надає йому здатності ефективно зв’язуватись з білками, порушуючи їх структуру. Тому через здатність до ефективного утворення комплексних сполук з амінами іони нікеля є потужними денатурантами білка.

Для перевірки агрегатного стану утворених білкових осадів було проведено спектроскопічне дослідження змодельованих білкових систем. Відомо, що ІЧ-спектри більшою мірою чутливі до змін в β -структурі, тому під час проведення дослідження спостерігались два характерних піки в області 1620-1624 і 1690-1696 $1/\text{см}$, що відповідають антипаралельним β -шарам і які досить віддалені від піків паралельних β -шарів і від інших елементів вторинної структури. При агрегації білків найчастіше спостерігається екстенсивне утворення додаткових антипаралельних β -шарів. Характерне «плече» β -структур виявлене лише в нікель-вміщуючих зразках при рН 5,5, в той час як за відсутності йонів нікелю агрегація має хаотичний характер, а саме у зразку, який не містить нікелю, характерна смуга антипаралельної β -структури білку (1615 – 1630 $1/\text{см}$) майже відсутня

Отримані результати створюють нові можливості для розуміння процесів агрегації білків за умов *in vivo* та *in vitro*, розширює можливості виявлення подібного роду структур та запобігання їх утворенню. Показано утворення дисперсних агрегатів, що інтенсивно забарвлюються та осаджуються за взаємодії зі специфічний для β -структурованих утворень барвником Конго червоним. Забарвлені Конго червоним β -складчасті білкові структурами є саме такими оптично активними об’єктами, що спостерігаються у вигляді яблучно-зелених включень на темному тлі оптично неактивних

тканин. Це дає змогу безпомилково виявляти забарвлені Конго червоним β -складчасті білкові структури. На додачу до цих властивостей відомо, що Конго червоний ефективно осаджує мікро- та наночастки β -складчастих білкових агрегатів та має властивості типового кислотно-основного індикатора з рН переходу від червоного до синього 5,2 – 3,0. Останню обставину необхідно враховувати при дослідженні білкових агрегатів за різних рН.

Створена експериментальна модель отримання перехідної форми білкових агрегатів видається перспективною щодо подальших досліджень впливу на цей процес як *in vitro*, так і *in vivo*, що є необхідною передумовою для цілеспрямованого втручання та корекції зумовлених агрегацією білків захворювань. Таким чином, в ході дослідження було виявлено, що порушення конформаційної стабільності білка можуть бути ключовими ланками патогенезу цілого ряду захворювань людини. Таке уявлення відкриває перспективи для вивчення медичних та біологічних проблем. Здатність протеїнів до патогенної конформації, безсумнівно, залежить від їх первинної структури. Однак на їх властивості та структуру можуть впливати і багато інших внутрішніх та зовнішніх факторів. Наведені в дослідженні факти свідчать про те, що різні порушення конформаційної стабільності протеїнів є типовою формою порушення структури і метаболізму білків.

Загалом робота присвячена дослідженню механізмів структуроутворення білків та моделюванню окремих їх ланок. В останні роки дедалі більшої уваги дослідників зазнають роботи, присвячені з'ясуванню процесів утворення β -структурованих білкових агрегатів - характерних для різноманітних захворювань аномальних включень в тканинах. Імуногенність, висока стійкість до протеолізу та здатність до автохтонного розростання за рахунок сорбції та перебудови розчинних білків надає подібним включенням комплекс властивостей, що за тяжкістю впливу на організм перевищує вихідні метаболічні порушення. Не менш вагомими є наслідки агрегації білкових препаратів медикаментозного призначення, оскільки найменша домішка агрегованих похідних сприяє розвитку імунної реакції як на введений

препарат, так і на власні білки, функціональну нестачу яких має компенсувати введений препарат. Тому моделювання процесів, що опосередковують агрегаційні процеси, належать до провідних напрямків сучасної біохімії.

Продумане застосування сучасних біохімічних та біофізичних методів дало змогу успішно виконати поставлені завдання. Досліджено конформаційний стан утворених білкових агрегатів методом оптичної та поляризаційної мікроскопії з застосуванням споріднених до β -складчастих листків специфічних барвників. У співпраці зі співробітниками Інституту фізики НАН України підтверджено утворення β -складчастих структур під впливом іонів нікелю. Останній результат не тільки пояснює відомі дані про гаптеніві властивості іонів нікелю, але й забезпечує отримання індукторів регулярного та передбачуваного агрегаційного процесу.

ВИСНОВКИ

1. На прикладі яєчного лізоциму та сироваткового альбуміну людини показано первинне утворення поодиноких сферолітів з переходом до формування оптично активних агрегатів, що специфічно взаємодіють з барвником Конго червоним.
2. При порівнянні агрегаційних властивостей яєчного лізоциму та альбуміну людини показано залежність схильності білка до агрегації від його амінокислотного складу.
3. Показано, що агрегаційний процес супроводжується конформаційним переходом “ α -спіраль – β -укладка” з утворенням значних за розміром і тому видимих в оптичний мікроскоп β -структурованих фібрил. Це добре узгоджується з відомими даними щодо енергетичної вигідності подібного переходу.
4. Доведено здатність іонів нікелю обумовлювати процес агрегації білка навіть за найменшого з досліджуваних в нашій роботі значень концентрації йонів нікелю. Подібна здатність пояснює причини контактного дерматиту, обумовленого контактом з предметами з нікельвміщуючих сплавів та з нікельованим покриттям.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сулацкая АИ. Особенности взаимодействия флуоресцентного красителя тиофлавина Т с амилоидными фибриллами. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2011;3(129):123–7.
2. Афанасьева АН, Одинцова ИН, Удут ВВ. Синдром эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа. Анестезиология и реаниматология. 2007;4:67-71.
3. Clark DP, Russell LD. *Molecular Biology Made Simple and Fun*. 4th ed. Cache River Press, 2010.
4. Jahn TR, Radford SE. The Yin and Yang of protein folding. FEBS Journal. 2005Oct;272(23):5962–70.
5. Демченко АП. Люминисценция и динамика структуры белков. Киев: Науковадумка; 1988. 280 с.
6. Костантино ГР, Швендеман СР, Лангер Р, Клибанов АМ. Повреждение препаратов лиофилизированных белков. Биохимия. 1998;63(3):422-9.
7. Griebenow K, Klivanov AM. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995;92(24):10969–76.
8. Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;98(9):2909–34.
9. Pekar A, Sukumar M. Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: Practical considerations that affect precision and accuracy. Analytical Biochemistry. 2007;367(2):225–37.
10. Olsen SN, Andersen KB, Randolph TW, Carpenter JF, Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-

- amylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2009;1794(7):1058–65.
11. Strambini GB, Gonnelli M. Protein Stability in Ice. *Biophysical Journal*. 2007;92(6):2131–8.
 12. Pikal-Cleland KA, Cleland JL, Anchordoquy TJ, Carpenter JF. Effect of Glycine on pH Changes and Protein Stability During Freeze–Thawing in Phosphate Buffer Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;91(9):1969–79.
 13. Verevka SV. Parametabolic β -aggregation of proteins: familiar mechanisms with diverse sequels. Vol. 72, *Advances in Medicine and Biology*. 2013. 29-48 p.
 14. Lee CC, Sun Y, Huang HW. Membrane-mediated peptide conformation change from α -monomers to β -aggregates. *Biophysical Journal*. 2010;98(10):2236-45.
 15. Sideras K, Gertz MA. Amyloidosis. *Adv Clin Chem*. 2009;47:1-44.
 16. Comenzo RL. Amyloidosis. *Curr. Traet. Opinions Oncol*. 2009;7(3):225-36.
 17. Gazit E. Self Assembly of Short Aromatic Peptides into Amyloid Fibrils and Related Nanostructures. *Prion*. 2007;1(1):32–5.
 18. Krebs MRH, Bromley EHC, Rogers SS, Donald AM. The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. *Biophys J. Proceedings of the National Academy of Sciences*. Oct2004;101(40):14420-42.
 19. Chaudhuri TK, Paul S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS Journal*. 2006;273(7):1331–49.
 20. Farrugia A. Albumin Usage in Clinical Medicine: Tradition or Therapeutic? *Transfusion Medicine Reviews*. 2010;24(1):53–63.
 21. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering Design and Selection*. 1999Jun;12(6):439–46.

22. Заболотний ДІ, Белоусова АО, Зарицька ІС, Верьовка СВ. Аутохтонна β -агрегація білків: причини, молекулярні механізми та патологічні наслідки. Журнал НАМН України. 2014;24(4):385-92.
23. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *The Lancet*. 1997;350(9071):134–8.
24. Picker MM, Dogan A, Herrera G. *Amyloid and Related Disorders. Surgical Pathology and Clinical Correlations*. NY: Springer, 2012.
25. Westermark P, Benson M, Baxbaum J, Cohen A, Frangione B, Ikeda S, Masters C, Merlini G, Saraiva G, Sipe J. Amyloid: toward terminology clarification. *Amyloid*. 2005;12(1):1-4.
26. Siragelo I, Malmo C, Ianuzzi C, Mezzogiorno A, Bianco R, Papa M, Irace G. Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F. *J. Biol. Chem*. 2004;279 (13):13183-89.
27. Lee E, Park Y, Dong Y, Mook-Jung I, Yoo Yu J. Cytosolic amyloid β -peptide 42 escaping from degradation induces cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;344(2):471-7.
28. Buxbaum J. The genetics of the amyloidoses: interactions with immunity and inflammation. *Genes & Immunity*. 2006;7(6):439–49.
29. Uversky VN, Fink AL. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2004;1698(2):131–53.
30. Husby G, Marhaug G, Downton B, Sletten K, Sipe J. Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid*. 1994;1(1):119-137.
31. Jaikaran ET, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2001;1537(3):179–203.
32. Verevka SV. Peptide contamination of cell membranes in etiology of chronic noninfectious diseases. Nova Science Publishers. 2012;56:129-38.

33. Kleinschmidt JH, Tamm LK. Folding Intermediates of a β -Barrel Membrane Protein. Kinetic Evidence for a Multi-Step Membrane Insertion Mechanism. *Biochemistry*. 1996;35(40):12993–3000.
34. Hancock EW. Differential diagnosis of restrictive cardiomyopathy and constrictive pericarditis. *Heart*. 2001;86(3):343–9.
35. Stasyshyn AV. Inhibitory form of haemophilia. *Molecular Pathology of Proteins*. 2009:41-56.
36. Shevel MV, Verevka SV. The problems of protein preparations stability: molecular autodamages and their functional consequences. *Molecular Pathology of Proteins*. 2009;23-30.
37. Глинка Н.Л. *Общая химия. Учебное пособие для вузов*. М., 1985.
38. Okazaki Y, Gotoh E. Metal release from stainless steel, Co–Cr–Mo–Ni–Fe and Ni–Ti alloys in vascular implants. *Corrosion Science*. 2008;50(12):3429–38.
39. Österberg R, Sjöberg B, Persson D. Cr(III)-Induced polymerization of human albumin. *Biological Trace Element Research*. 1981;3(3):157–67.
40. Bonefeld CM, Nielsen MM, Vennegaard MT, Johansen JD, Geisler C, Thyssen JP. Nickel acts as an adjuvant during cobalt sensitization. *Experimental Dermatology*. 2015;24:229–31.
41. Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007;57(5):287–99.
42. Nielsen NH, Menné T. Nickel sensitization and ear piercing in an unselected Danish population. *Contact Dermatitis*. 1993;29(1):16–21.
43. Walton S, Nayagam AT, Keczkas K. Age and sex incidence of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1986;15(3):136–9.
44. Allen SE, editor. *Chemical analyses of ecological materials*. Boston Melbourne: Blackwell Scientific Publications; 1989. 213-4.

45. Myron DR, Zimmerman TJ, Shuler TR, Klevay LM, Lee DE, Nielsen FH. Intake of nickel and vanadium by humans. A survey of selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1978Jan;31(3):527–31.
46. Kanerva L, Elsner P, Wahlberg JE, Maibach HI. *Handbook of occupational dermatology*. New York: Springer; 2000.
47. Morgan LG, Flint GN. Nickel alloys and coatings: release of nickel. *Nickel and the skin: immunology and toxicology*. 1989;45-54.
48. Blausen. Medical gallery of Blausen Medical. *WikiJournal of Medicine*. 2014;1(2):10.
49. Ковальська ВБ. Флуоресцентні барвники для детекції білків різної просторової будови [дисертація]. Київ, 2012.
50. Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1989;37(8):1273–81.
51. Ремизов АН. *Медицинская и биологическая физика*. 7-е изд. М.: Дрофа; 2007. 124–129.
52. Заболотный ДИ, Белоусова АА, Савченко ТД, Драгомырик ЮВ, Вережка СВ. Случаи локального амилоидоза верхних дыхательных путей. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*. 2013;5:75-9.
53. Vuxbaum J, Linke R. A molecular history of the amyloidosis. *J. Mol. Biol*. 2012;421:142-59.
54. Held P, Becker K. Analysis of α -synuclein fibril formation *in vitro*. *BioTek*. 2014.
55. Заболотный ДИ, Яремчук СЭ, Карпенко ГФ, Носенко ОА, Голобородько ОП. Исследование активности протеолитических ферментов в ткани полипов и слизистой оболочке полости носа. *Журн. вушних, носових та горлових хвороб*. 2003;3:182-3.
56. Chin D, Harvey RJ. Nasal polyposis. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 2013;21(1):23–30.

57. Wytiske JF, Lund VJ, Joachim M, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N et al. Chronic Rhinosinusitis with or without nasal polyps (CRSwNP or CRSsNP). European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology*. 2012;50(23):55-87.
58. Calus L, Zele TV, Derycke L, Krysko O, Dutre T, Tomassen P, et al. Local Inflammation in Chronic Upper Airway Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2012Jan;18(16):2336–46.
59. Бейтс Р. Определение pH. Теория и практика. Изд. 2-е, испр. Л.: Изд. „Химия“, 1972. 400 с.
60. Benditt EP, Eriksen N, Berglund C. Congo Red Dichroism With Dispersed Amyloid Fibrils, An Extrinsic Cotton Effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1970Jan;66(4):1044–51.
61. [https://www.olympus-lifescience.com/en/microscopes/upright/bx53f2-p/#!cms\[focus\]=cmsContent5649](https://www.olympus-lifescience.com/en/microscopes/upright/bx53f2-p/#!cms[focus]=cmsContent5649)
62. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. Применение физико химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1980. 582 с.
63. Кудряшова Е.В. Структура и функциональные свойства биомолекул на поверхностях раздела фаз. Новые методы исследования. М.: Хим. Фак. МГУ, Москва, 2013. 145 с.
64. Foderà Vito, Groenning M, Vetri V, Librizzi F, Spagnolo S, Cornett C, et al. Thioflavin T Hydroxylation at Basic pH and Its Effect on Amyloid Fibril Detection. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(47):15174–81.
65. Expósito IL, Recio I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*. 2006;16(11):1294–305.
66. Semerdzhiev SA, Dekker DR, Subramaniam V, Claessens MMAE. Self-Assembly of Protein Fibrils into Suprafibrillar Aggregates: Bridging the Nano- and Mesoscale. *ACS Nano*. 2014;8(6):5543–51.
67. Wu C, Wang Z, Lei H, Zhang W, Duan Y. Dual Binding Modes of Congo Red to Amyloid Protofibril Surface Observed in Molecular Dynamics

Simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(5):1225–32.

68. Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений. М.: МГУ имени М.В. Ломоносова, хим. фак., кафедра органической химии, Москва, 2012. 55 с.