

# ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

“Журнал НАМН України”, 2014, т. 20, № 4. — С. 385-392.

УДК 577.112:612.014.3

Д. І. Заболотний, А. О. Белоусова, І. С. Зарицька, С. В. Верьовка

Державна установа “Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України”,  
03680 Київ

## АУТОХТОННА $\beta$ -АГРЕГАЦІЯ БІЛКІВ: ПРИЧИНИ, МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТА ПАТОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ

Проаналізовані наукові здобутки останніх років, які зумовлюють підвищений інтерес до так званих місфолдингових захворювань – патологій, зумовлених порушенням формування структури тих чи інших білків. Серед подібних захворювань особливе місце посідають процеси, пов’язані з утворенням  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів. Існуючі дані дають змогу визначити  $\beta$ -агрегацію білків *in vivo* як аутохтонний комплекс порушень процесів молекулярного та клітинного рівнів, що розвивається незалежно від первинних причин виникнення та істотно впливає на перебіг фізіологічних процесів. Практично незворотний характер утворення  $\beta$ -агрегатів, їх здатність до росту за рахунок сорбції та структурної перебудови розчинних білків, стабільність, імуногенність, стійкість до протеолізу та здатність до активації протеолітичних процесів призводять до тяжких порушень нормального функціонування організму. Достатньо універсальний характер механізмів запуску  $\beta$ -агрегації робить її вагомим патологічним чинником, що далеко виходить за межі класичних уявлень про амілоїдогенні процеси та має бути врахованим при з’ясуванні етіології різноманітних ускладнень, що зумовлені порушенням процесів обміну білка.

**Ключові слова:** місфолдинг,  $\beta$ -агрегація, амілоїдоз, поліпоз.

### Механізми формування нативної структури білків та можливі альтернативи нативного фолдингу

Геном людини налічує понад 20 тисяч генів, що з урахуванням можливостей альтернативного сплайсингу може забезпечити біосинтез понад 50 тисяч білків. При цьому кожна з білкових молекул являє собою вкрай складний молекулярний об’єкт, що перебуває в стані динамічної рівноваги між більш чи менш стабілізованими відхиленнями від умовної норми. Будь-яке істотне відхилення від нативної конформації призводить до втрати білком його функціональної активності (денатурації). Ступінь термодинамічної стабілізації різних білків коливається у вельми широкому діапазоні — від інтегрально неструктурованих білків до високоста-

білізованих та жорстко фіксованих структур, однак неодмінною умовою функціональної активності кожної з білкових молекул є набуття єдиної, вірної лише для неї, конформації.

Білковим молекулам притаманна багаторівневість структури. Первинною структурою білка є його амінокислотна послідовність, що задається генетично та лишається незмінною протягом життя даного організму. Регулярний характер поліпептидного ланцюга спільно з комплексом внутрішньомолекулярних взаємодій забезпечують формування елементів вторинної структури —  $\alpha$ -спіральних ділянок,  $\beta$ -складчастих структур, тих чи інших перегинів та неупорядкованих ділянок. Нерідко елементи вторинної структури утворюють більш

Д. І. Заболотний — директор інституту, акад. НАМН України

А. О. Белоусова — зав. патогістологічної лабораторії клініки, керівник групи патоморфології, к.м.н.

І. С. Зарицька — провід.н.с. відділу запальних захворювань ЛОР-органів, к.м.н.

С. В. Верьовка — зав. лабораторії біохімії, д.б.н. (amtc@kndio.kiev.ua)

© Д. І. Заболотний, А. О. Белоусова, І. С. Зарицька, С. В. Верьовка, 2014.

чи менш стабілізовані угруповання — домени, що подекуди визначаються як структурні елементи рівня “два плюс”. Третинна структура білкової глобули є своєрідним компромісом між внутрішньо-молекулярними взаємодіями елементів вторинної структури та навколишнім оточенням, четвертинна ж структура притаманна олігомерним білкам і складається з кількох окремих білкових глобул. Формування вторинної структури зумовлене комплексом гідрофобних, іонних, водневих, Ван-дер-Ваальсових та торсійних взаємодій між відповідними компонентами поліпептидного ланцюга, іншими словами — визначається переважно первинною структурою. Натомість третинна структура більшості білків формується під впливом шаперонових білків системи фолдингу, що забезпечують своєрідну “рихтовку” поверхні молекули, виключаючи тим самим утворення поверхневих угруповань, що не відповідають прийнятим в даній біологічній системі структурним правилам. Варто підкреслити, що перебіг цього процесу відбувається не в бік мінімізації вільної енергії, а є енергоємним та АТФ-залежним процесом, що опосередкований формуванням локальних енергетичних мінімумів. При цьому первинна послідовність утвореного білка та структурні правила, за якими відбувається опосередковане шаперонами формування структури білка, є еволюційно узгодженими між собою. Тому гарантоване утворення нативної білкової структури може бути забезпечено лише за його біосинтезу в рідній клітинній системі, оскільки продуковані трансгенними клітинами рекомбінантні білки зазнають агрегації, утворюючи так звані тільця включення —  $\beta$ -структуровані білкові депозити, що спільно з інактивованою формою цільового білка містять інактивовані компоненти шаперонової системи та убіквітин. Повноцінна реактивація цільового білка (технологічний рефолдинг) становить складну і все ще далеку до ефективного рішення проблему сучасної біотехнології [10]. Спонтанна  $\beta$ -агрегація різноманітних білкових препаратів не лише зменшує вміст функціонально активної складової, але й призводить до розвитку зумовлених нею аутоімунних реакцій [11]. Ті ж причини зумовлюють наявність подібного роду включень в ГМО-вмістних продуктах харчування, що створює ризик розвитку аутоімунних та онкологічних захворювань [8]. Всі ці ефекти обумовлені комплексом властивостей, притаманних  $\beta$ -структурованим білкам та їх агрегатам.

#### **Особливості $\beta$ -укладки: кількісні зміни з якісно новими ефектами**

Як відомо,  $\beta$ -укладка поліпептидного ланцюга належить до розповсюджених елементів вторинної

структури більшості білків. Спільно з  $\alpha$ -спіралями, неструктурованими фрагментами та різного роду більш чи менш стандартними перегинами вони формують пептидну основу третинної структури білкової глобули. Нерідко  $\beta$ -укладка не обмежується поодиноким фрагментом поліпептидного ланцюга, а утворює  $\beta$ -складчасті листки — фіксовані міжланцюговими водневими зв'язками між  $C=O$  та  $NH$ -групами поліпептидних ланцюгів структури, в якій окремі ділянки ланцюга (тяжі) начебто розміщені в площині багатократно зігнутого паперового листка. Мінімальна протяжність тяжа становить 6 амінокислотних залишків, в ширину ж  $\beta$ -складчастий лист містить від 4 до 6 тяжів, орієнтованих в протилежні або в однакові напрямки (антипаралельна  $\beta_a$ - та паралельна  $\beta_p$ -складчасті структури, відповідно).  $\beta_a$ -структура енергетично більш вигідна, ніж  $\beta_p$ , однак розповсюджені вони приблизно однаково. Змішаний тип  $\beta$ -листок зустрічається значно рідше. В більшості розчинних білків  $\beta$ -структуровані фрагменти зустрічаються спільно з  $\alpha$ -спіралізованими та неструктурованими ділянками, однак серед трансмембранних білків досить поширені так звані  $\beta$ -барильця — циліндричні структури, сформовані лише  $\beta$ -тяжами. Поряд з високим рівнем опірності до дії більшості протеолітичних ферментів  $\beta$ -складчасті структури відрізняються високим рівнем стабільності. Остання обставина надає їм здатності до сорбції розчинних білків з індукцією конформаційної перебудови останніх по типу “ $\alpha$ -спіраль —  $\beta$ -структура” з формуванням  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів [26, 35]. Через енергетичну вигідність подібного процесу його перебіг відбувається спонтанно, параметаболічним шляхом, тобто без ферментативного каталізу. Зазначимо, що самоскладання білків структур у бік мінімізації вільної енергії певною мірою імітує Анфінсенівське структуроутворення. Щоправда, утворювані при цьому структури мало подібні до нативних форм. За умов *in vivo* подібні утворення однозначно розпізнаються компонентами фолдингових та кліренсових систем організму як “чужі”, що підлягають виправленню чи елімінації [30]. Тобто здатність стабілізованих  $\beta$ -структурованих матриць індукувати конформаційну перебудову сорбованих ними білків не лише призводить до порушення структури та інактивації останніх з утворенням нового шару  $\beta$ -структурованого білка, але й істотно порушує функціонування різноманітних систем організму [36]. Цілком ймовірно, що подібні процеси відіграють істотну роль у формуванні незбалансованої імунної відповіді — молекулярної основи алергічних захворювань [35]. Однак значно більш драматичні наслідки пов'язані з таким проявом параметаболічного структуроутворення білків, як амілоїдоза.

### Амілоїдози: відмінні та спільні риси

Амілоїдози становлять велику групу захворювань, за яких нормальні білки як після, так і без протеолітичного розщеплення утворюють амілоїдні фібрили — високоструктуровані олігомери  $\beta$ -структурованих білкових молекул [33]. Подібні депозити можуть бути як локальними, органоспецифічними, так і генералізованими. Їх утворення в найрізноманітніших тканинах та органах пов'язано з порушенням нормального функціонування організму. Амілоїдози становлять ускладнення багатьох захворювань клітин крові, хронічних запалень, діабету, туберкульозу, множинної мієломи, прокази та інших захворювань. Окрему, як за локалізацією, так і за характером ушкодження тканин, групу складають амілоїдози центральної нервової системи, зокрема хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Крейцфельда — Якоба та інші, пов'язані з утворенням і накопиченням депозитів  $\beta$ -структурованого білка та прогресуючим ураженням клітин центральної нервової системи [12]. При цьому, незважаючи на інтенсивні, майже двохсотрічні, дослідження, ключові питання патогенезу амілоїдозів лишаються відкритими. Чим зумовлено різноманіття форм захворювання? Чи є утворення амілоїдних депозитів ускладненням традиційних захворювань чи вони становлять окрему, якісно відмінну, групу токсичних інтермедіатів? Чим зумовлена вражаюча структурна подоба депозитів, утворених різними білками за різних захворювань? Згідно з прийнятою класифікацією, розрізняють первинну, вторинну та спадкову форми амілоїдозів. До окремих груп віднесено сенільні та локальні форми. Спільною рисою білкових депозитів найрізноманітніших амілоїдних захворювань є високий вміст  $\beta$ -структурованого білка, чиї  $\beta$ -складчасті шари орієнтовані паралельно головній осі фібрили, утворюючи основу стабільного та нерозчинного за умов *in vivo* амілоїдного агрегату. При цьому, однак, якихось спільних рис між вихідними білками не виявлено. Так, відомо щонайменше 25 амілоїдогенних білків, які начебто не мають між собою нічого спільного [34]. Єдине, що їх об'єднує, — це здатність за певних умов утворювати агрегати з подальшим відкладенням амілоїду відносно невеликих розмірів (не більше 30 кДа) в агрегат окремих молекул. При цьому, однак, варто звернути увагу на функціональну роль цих білків. За системних амілоїдозів основну складову утворюваних агрегатів становлять цілі чи частково протеолітично деградовані білки з вираженими рекогнітивними та асоціативними властивостями. Так, чи не найпоширеніші форми амілоїдів утворені легкими та, меншою мірою, важкими ланцюгами імуноглобулінів. Як відомо, рекогнітивні властиво-

сті окремих ланцюгів є вкрай невисокими, тоді як взаємодії цільних антитіл з антигенами належать до найшвидших реакцій міжбілкового комплексотворення. Зрозуміло, що поверхня денатурованого та зазнавшого функціонально необумовленої  $\beta$ -структуризації білка однозначно розпізнається компонентами імунної системи як набір стабілізованих "чужих" епітопів, що підлягають зв'язуванню та вилученню з обігу [30]. Однак, на відміну від більшості антигенів,  $\beta$ -агрегований білок виявляє властивості, що не лише ускладнюють вилучення утворених імунних комплексів, але й сприяють збільшенню білкового агрегату. Нерозчинність, висока стабільність, а головне — здатність перебудувати зв'язані білки — призводять до якісних змін процесу взаємодії імуноглобулінів з  $\beta$ -структурованим антигеном. Замість утворення розчинного комплексу антиген-антитіло, що підлягає вилученню, відбувається перебудова частини молекули імуноглобуліна, що знаходиться в безпосередньому контакті з  $\beta$ -складчастою структурою. При цьому, частини молекули, що зазнали індукованої перебудови, стають маловразливими до дії протеїназ, які ефективно відщеплюють ті частини молекули, що не зазнали подібної перебудови. Тим самим імуноглобуліни втрачають захисну функцію та перетворюються на новий будівельний матеріал для розростання агрегату. Спостерігається певна аналогія з механізмом формування незбалансованої імунної відповіді, спричиненої вибірковою ураженням компонентів імунної системи, що лежить в основі формування алергічних процесів [35].

В подібному контексті загальноприйнятий розподіл амілоїдозів на первинні (з невизначеною етіологією) та вторинні (що виникають як ускладнення різноманітних захворювань) видається більш ніж умовним, оскільки в основі як тих, так і інших лежать порушення процесів білкового обміну, що призводять до параметаболічного формування агрегатів  $\beta$ -структурованого білка. Утворення амілоїдів нерозривно пов'язане з цілим комплексом порушень на молекулярному, клітинному та тканинному рівнях живого організму. Тож нема нічого дивного в тому, що амілоїдні ускладнення різко погіршують перебіг первинного захворювання, практично не піддаються лікуванню та визнаються вкрай поганим прогностичним показником. При цьому, однак, лишається відкритим питання щодо ключової стадії запуску процесу амілоїдоутворення — шляхів утворення первинної  $\beta$ -агрегованої матриці.

### Тригерні механізми $\beta$ -агрегації білків

Зрозуміло, що процеси формування амілоїдів аж ніяк не обмежуються групою взаємодій антиген-антитіло. Не менш, якщо не більш важливим

фактором процесу амілоїдоутворення є білкові та пептидні компоненти ендогенної інтоксикації — невід'ємного супутника патологій, що за ускладнення призводять до амілоїдозів. Накопичення в тканинах та рідинах організму надлишкових кількостей продуктів нормального чи порушеного обміну речовин призводить до формування складного комплексу метаболічних та функціональних розладів, що ведуть до загального погіршення стану організму, поглиблення патологічного процесу та ускладнення терапії [1].

Сучасні системи класифікації ендотоксинів співвідносяться з їх складом, походженням та молекулярною масою. Визнають три ключові стадії процесу ендогенної інтоксикації. Перша є реакцією на травматичне пошкодження чи формування первинного деструктивного вогнища. Друга стадія зумовлена проривом гістогематичного бар'єру; при цьому ендотоксини потрапляють до кровообігу, розповсюджуються та накопичуються в організмі. Третя є наслідком тяжкого ушкодження органів та систем, а також розвитку їх функціональної декомпенсації [1]. Основна роль в розвитку ендогенної інтоксикації традиційно відводиться молекулам середньої маси — складному за структурою та механізмами впливу на організм комплексу сполук білкової та небілкової природи з молекулярною масою від 500 до 5000 Да [4]. Проте, не меншої уваги варті низько- та, особливо, високомолекулярні ендотоксини. До останніх належать білкові молекули з молекулярною масою понад 10 кДа, що утворюються внаслідок протеолітичного ушкодження найрізноманітніших білків після надмірної активації протеоліза — одного з найбільш загальних молекулярних механізмів ушкодження тканин при розвитку запалення будь-якої етіології [23]. Тому локальне накопичення найрізноманітніших ендотоксинів на початковій стадії процесу формування ендогенної інтоксикації носить закономірний характер. При цьому утворення похідних білків, що зазнали нефункціонального протеолізу, не означає негайне їх вилучення з обігу компонентами кліренсових систем організму. Подібні структурно ушкоджені білки зберігають здатність до тривалої циркуляції в кровообізі та до істотного впливу на процеси, опосередковані нативними білками. Водночас зумовлена нефункціональним протеолізом дестабілізація структури може стати причиною конформаційних змін в бік мінімізації вільної енергії з утворенням  $\beta$ -структурованих агрегатів. Подібний процес може проходити спонтанно, внаслідок неферментативного глікозилювання чи будь-яких інших асоціативних процесів [14, 20, 26]. Однак особлива роль у формуванні первинної  $\beta$ -структурованої

матриці та подальшому агрегатоутворенні належить процесам, опосередкованим взаємодією структурно дестабілізованих білків та пептидів з подвійним фосфоліпідним шаром клітинних мембран. Процес так званого мембранного фолдингу відбувається за певними закономірностями і протікає щонайменше в чотири стадії — сорбції поліпептидного ланцюга на поверхні подвійного фосфоліпідного шару, набуття сорбованим поліпептидом  $\alpha$ -спіралізованої структури, інкорпорації утвореної  $\alpha$ -спіралі у подвійний фосфоліпідний шар та перебудова  $\alpha$ -спіралізованих ділянок на  $\beta$ -складчасті структури [31]. Вони здатні до міжмолекулярної асоціації — як між собою, так і з інтегральними білками клітинних мембран. Це призводить не лише до порушення нормального функціонування найрізноманітніших клітинних рецепторів та переносників, але й істотно змінює імунний статус поверхні клітини, перетворюючи її на мішень для відповідних компонентів імунної системи, а також веде до розвитку неконтрольованого протеолізу [9, 32]. Наведені дані, а також виражена синхронність розвитку ендогенної інтоксикації та подальшого амілоїдоутворення дають підстави вважати, що в більшості випадків утворення початкової  $\beta$ -структурованої матриці опосередковано саме мембранним фолдингом структурно розбалансованих білків та пептидів. Тобто утворення первинної  $\beta$ -структурованої матриці визначається появою білків, що з тих чи інших причин втратили або не набули стабілізованої нативної конформації. Подальше зростання агрегату може протікати як шляхом асоціації утворених первинних осередків агрегату, так і за нуклеаційним механізмом, ініційованим взаємодією розчинних білків з первинною матрицею білкових компонентів кліренсових та фолдингових систем. Подібний процес веде до формування фібрил [24]. Отже, незалежно від природи задіяних в процесі білків утворюються вельми подібні між собою нерозчинні депозити, чий вплив на перебіг фізіологічних процесів може значно перевищувати первинну причину молекулярних порушень.

#### **Штучна ініціація $\beta$ -агрегації білків *in vitro* та *in vivo***

Одним з наслідків високої енергетичної вигідності  $\beta$ -агрегаційних процесів є відносна легкість їх відтворення як *in vitro*, так і *in vivo*. Подібно до вже згаданого аутоушкодження білкових препаратів внаслідок контактної денатурації, подібний процес став основою припущення про здатність патологічної форми пріонового білка перебудувати нативні молекули в патогенні. Дійсно, за спільної інкубації обох форм різко зростає кількіс-

ний вміст  $\beta$ -структур, однак кількість інфекційного матеріалу лишається незмінною [18]. Відомо безліч прикладів індукованої  $\beta$ -структурованою матрицею найрізноманітніших розчинних білків, що не задіяні в будь-яких патологічних процесах [23, 24]. Тобто, індукована патогенною ізоформою перебудова нативної форми пріонового білка на якісь  $\beta$ -структуровані утворення не має жодного відношення до механізмів пріон-зумовленого патогенезу. Натомість доведено, що патогенна форма набуває протеїназостійкості та інфекційності лише після перебування в зовнішній клітинній мембрані, тобто внаслідок мембранного фолдингу [16]. Навіть тимчасове блокування протеїназ протеасомного комплексу призводить до агрегативних процесів, тобто накопичення відпрацьованих білків є достатнім чинником для утворення білкових агрегатів [28]. Проте потужний денатураційний вплив ультразвукової соніфікації клітинного матеріалу забезпечує переважання шаперонової системи і, як наслідок, формування новосинтезованого пріонового білка в патогенну конформацію без вихідної інфекційної дози [13].

Спроби моделювання амілоїдозів за умов *in vivo* проводилися ще у 90-х роках XIX сторіччя і пов'язані з діяльністю основоположника російської та радянської фармакології М. П. Кравкова. Наведені в його дисертаційній роботі "Об амилоидозе, экспериментально вызываемом у животных" (1894 р.) методичні підходи не втратили своєї актуальності, зазнали розвитку та поглиблення. Так, застосовують введення в кровообіг волокон шовку [21], підшкірне введення альбуміну [3], інтрацеребральну ін'єкцію гомогенатів амілоїдних депозитів [29]. Амілоїдоз може бути ініційованим надмірним годуванням піддослідних тварин казеїн-вміщуючою їжею [25], тобто внаслідок надходження до організму білків та пептидів у кількостях, що перевищують можливості травної та кліренсової систем організму. Крім того, відомо й про розвиток амілоїдозу у трансгенних ховрахів, що оверекспресують пріонової білок мишей [19]. Тут йдеться про наслідок перевищення синтезом чужорідного білка можливостей шаперонової системи. Варто підкреслити, що порушення нативної структури білка визнається вагомим фактором, що сприяє  $\beta$ -агрегації [20]. У контексті викладеного матеріалу можна впевнено говорити про участь в подібних перебудовах нефункціонального протеолізу, глікації та асоціативних процесів, опосередкованих взаємодією білкових молекул з подвійним фосфоліпидним шаром клітинної мембрани або з готовою  $\beta$ -структурованою матрицею. Тобто будь-які процеси, пов'язані з порушенням білкового обміну, є фактором ризику розвитку

$\beta$ -агрегації білків та зумовлених нею патологічних порушень.

#### Амілоїдоз *sine nobilitate* чи просто неврахована $\beta$ -агрегація?

Як відомо, методи виявлення скільки-небудь значних  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів давно й успішно використовуються для діагностики різноманітних форм амілоїдозів, добре відпрацьовані, загально визнані та не становлять будь-яких методичних труднощів [15, 22]. Внаслідок регулярності структури  $\beta$ -структуровані білкові агрегати високовибірково сорбують різноманітні барвники, зокрема конго червоний. Засновані на цій властивості методи є загально визнаними, протокольними та широко застосовуються як при гістологічних дослідженнях, так і для прижиттєвої діагностики амілоїдозів визначенням кількості сорбованого барвника за його внутрішньосудинного введення (проба Бенгольда). Та ж регулярність структури  $\beta$ -агрегованих білків надає їм здатності відхиляти поляризоване світло, що робить їх видимими в поляризаційній мікроскоп на фоні затемнених, позбавлених оптичної активності тканин. Ця властивість різко посилюється при застосуванні барвника конго червоний. Профарбовані ним в різні відтінки червоного кольору  $\beta$ -агреговані білки при спостереженні в поляризаційному мікроскопі видаються забарвленими в яблучно-зелений колір (рис. 1) [32]. Щоправда, лишається відкритим питан-

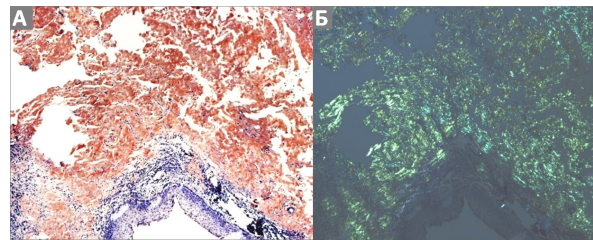


Рис. 1. Біоптат локального амілоїдозу піднебіння. Хвора О. 28 років. Скупчення амілоїдних мас в слизовій оболонці. Забарвлені  $\beta$ -структуровані білкові агрегати (конго червоний.  $\times 80$ ). А — світлова мікроскопія, Б — поляризаційна мікроскопія.

ня про доцільність застосування цього та інших відомих хромо- та флуорофорних барвників для виявлення  $\beta$ -агрегованих білкових включень при патологіях, які не належать до амілоїдозів. Як впливає з наведеного матеріалу, за наявності  $\beta$ -агрегованих включень про нормальне функціонування відповідних тканин організму не може бути й мови. Тож будь-які патологічні тканини, утворені внаслідок порушення нормального обміну речовин, незалежно від першопричини розвитку патологічного процесу мають бути перевірені на наявність  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів. Одним з найбільш підоз-

рілих з таких об'єктів є поліпи — своєрідні вирости на слизовій оболонці найрізноманітнішої локалізації. Незважаючи на багаторічні дослідження, етіологія поліпозів визнаного та загальноприйнятого пояснення не має. Найбільш ймовірною причиною утворення поліпів верхніх дихальних шляхів прийнято вважати локальні запальні процеси [17]. Наведені міркування зумовили проведення перевірки присутності в їх складі  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів за класичним методом забарвлення конго червоним з подальшим дослідженням методами звичайної та поляризаційної мікроскопії (рис. 2-4). Отримані дані дають підстави впевнено говорити про наявність в структурі судинних поліпів  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів, що, в свою чергу, дає змогу наблизитись до розуміння механізмів розвитку поліпозів [7]. Розглянутий приклад є характерним, але навряд чи поодиноким випадком утворення  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів за патології, що традиційно вважається ніяк не пов'язаною з амілоїдозами.

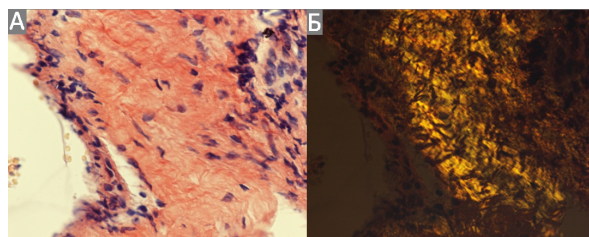


Рис. 2. Поліп носу. Хворий С. 30 років. Строма поліпа із запально-клітинною інфільтрацією, волокнистими структурами. Забарвлені  $\beta$ -структуровані білкові агрегати (конго червоний,  $\times 200$ ). А — світлова мікроскопія, Б — поляризаційна мікроскопія.

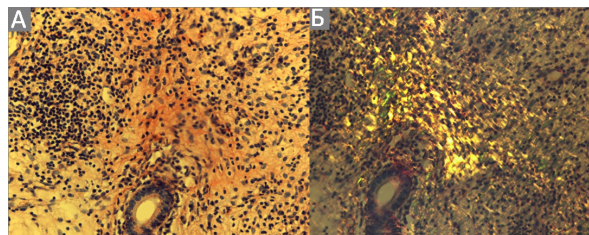


Рис. 3. Поліп носу. Хворий П. 37 років. Волокнисті структури поліпу з густою лімфоплазмозитарною інфільтрацією. Дифузне забарвлення  $\beta$ -структурованих агрегатів (конго червоний,  $\times 80$ ). А — світлова мікроскопія, Б — поляризаційна мікроскопія.

Наведені дані дають змогу вважати  $\beta$ -структуровані білкові депозити не як наслідок того чи іншого захворювання, а як повноцінну молекулярну складову патологічного процесу. Зокрема, у випадку судинних поліпів це дозволяє пояснити їх якісну відміну від оточуючої здорової тканини, практичну неефективність лікування медикамен-

тозними засобами та високий рівень рецидивів після оперативних вилучень.

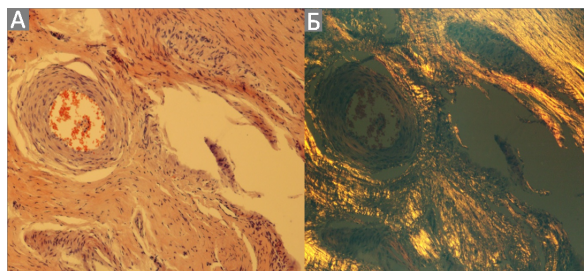


Рис. 4. Поліп носу. Хвора Б. 15 років. Судинний компонент поліпу. Периваскулярна локалізація  $\beta$ -структурованих агрегатів (конго червоний,  $\times 80$ ). А — світлова мікроскопія, Б — поляризаційна мікроскопія.

При цьому лишається відкритою ціла низка питань етіологічного характеру. Як вже було відзначено, нерозчинність, висока стабільність та здатність  $\beta$ -агрегованих утворень до перебудови сорбованих білків за власним образом та подобою перетворює білкові компоненти фолдингової та кліренсової систем організму на постачальників нового будівельного матеріалу для збільшення маси депозиту. Тож нема нічого дивного в тому, що основу більшості амілоїдів становлять білки з вираженими асоціативними властивостями,  $\beta$ -агреговані депозити при багатьох нейродегенеративних хворобах "засмічені" убіквітином [27], а  $\beta$ -агрегати утворюються при різноманітних захворюваннях в багатих на  $\alpha$ -кристалін кришталиках очей літніх людей [5]. Однак чи означають наведені приклади повну беззахисність організму стосовно утворення  $\beta$ -агрегованих білків? Чи існують механізми їх вилучення з організму і чи не є наслідком їх дії утворення кристалів Шарко — Лейдена та подібних їм  $\beta$ -агрегованих включень в виділеннях за найрізноманітніших захворювань? Чи є щось спільне між розглянутими процесами та утворенням білкових кристалів у тканинах рослин [2]? Чи відіграє мембранний фолдинг роль в стабілізації структури білкових компонентів ендогенної інтоксикації, а отже — й в процесах їх розпізнавання та вилучення? Яка роль клітинних компонентів імунної системи в локалізації процесу розповсюдження здатних до автохтонного росту білкових  $\beta$ -агрегатів? Ці та багато інших питань явно варті ретельного розгляду та досліджень.

#### Висновок

Викладені в даній роботі матеріали дають змогу зробити низку узагальнень щодо механізмів утворення та патологічного значення  $\beta$ -структуро-

ваних білкових агрегатів. Перш за все очевидно, що наявність подібних включень може бути більш поширеною, виходячи далеко за межі уявлень про амілоїдні захворювання. Утворення подібних депозитів відбувається при регулярних параметаболических процесах та набуває аутохтонного характеру незалежно від наявності первинних чинників, що ініціювали початок процесу. Внаслідок впливу на перебіг різноманітних фізіологічних процесів, на структуру оточуючих тканин, високу стабільність та здатність до самовідтворення за рахунок

різноманітних розчинних білків утворення  $\beta$ -агрегатів є ускладненням, що за своєю патологічною дією значно перевершує первинну причину. Тому ігнорувати можливу присутність подібних утворень щонайменше неприпустимо. Будь-які патологічні тканини, що утворились внаслідок різноманітних порушень нормального обміну речовин, процесів структуроутворення білків та вилучення з обігу їх відпрацьованих чи денатурованих похідних, мають бути перевірені на наявність  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів.

### Список використаної літератури

1. Афанасьєва А. Н., Одинцова И. Н., Удут В. В. Синдром эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа // *Анестезиология и реаниматология*. — 2007. — № 4. — С. 67-71.
2. Васильев А. Е., Гамалей Ю. В. Белковые кристаллы в клетках растений // *Цитология*. — 1975. — № 4. — С. 371-389.
3. Габуева А. А., Козырев К. М., Брин В. Б. Способ моделирования экспериментального амилоидоза у животных. Патент RU 2373581 С1, опубл. 20.11.2009, Заявка 2008128201.14 от 10.07.2008.
4. Громашевська Л. Л. "Середні молекули" як один з показників "метаболическої інтоксикації" в організмі // *Лабораторна діагностика*. — 1997. — № 1. — С. 11-16.
5. Еримілов В. В., Махонина О. В. Корреляция метаболических нарушений в структурах глаза со старением, апоптозом и зависимыми от возраста заболеваниями // *Вестник ВолгГМУ*. — 2011. — № 1. — С. 67-70.
6. Заболотный Д. И., Белоусова А. А., Савченко Т. Д. и др. Случаи локального амилоидоза верхних дыхательных путей // *Журн. вушних, носових і горлових хвороб*. — 2013. — № 5. — С. 75-79.
7. Заболотный Д. И., Белоусова А. А., Шуклина Ю. В., Верева С. В.  $\beta$ -агрегированные белки в патологически измененных тканях. III. Локальные воспаления как индуктор агрегации белков // *Лабораторна діагностика*. — 2014. — № 3. — С. 3-6.
8. Заболотный Д. И., Верева С. В. Трансгенні білки у ГМО-вмісних продуктах харчування: оцінка ризику // *Журн. НАМН України*. — 2012. — № 3. — С. 379-383.
9. Заболотный Д. И., Кизим О. Й., Верева С. В. Патологічні ефекти інтоксикації клітинних мембран ендогенними пептидами (огляд літератури і власних досліджень) // *Журн. НАМН України*. — 2011. — № 3. — С. 201-207.
10. Маркосян К. А., Курганов Б. И. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегатов // *Биохимия*. — 2004. — № 9. — С. 1196-1212.
11. Шевель М. В. Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути их предотвращения // *Современные проблемы токсикологии*. — 2006. — № 3. — С. 41-45.
12. *Amyloid and related disorders. surgical pathology and clinical correlations*. — New York: Springer, 2012. — 425 p.
13. Barria M., Mukherjee A., Gonzalez-Romero D. et al. *De novo* generation of infectious prion *in vitro* produces a new disease phenotype // *PLoS Pathog.* — 2009. — 5, № 5. — doi: 10.1371/journal.ppat.1000421.
14. Bouma B., Kroon-Batenburg L., Wu Y-P. et al. Glycation induces formation of amyloid cross- $\beta$  structure in albumin // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278, № 43. — P. 41810-41819.
15. Brigger D., Muckle T. Comparison of Sirius red and Congo red as stains for amyloid in animal tissues // *J. Histochem. Cytochem.* — 1975. — 23, № 1. — P. 84-88.
16. Caughey B., Raymond G. The scrapie-associated form of prp is made from a cell-surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive // *J. Biol. Chem.* — 1991. — 266, № 27. — P. 18217-18223.
17. *Chronic Rhinosinusitis with or without nasal polyps (CRSwNP or CRSsNP)* // *Rhinology*. — 2012. — 50, Suppl. 23. — P. 55-87.
18. Hill A., Antoniou M., Collinge G. Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity // *J. Gen. Virol.* — 1999. — 80, № 1. — P. 11-14.
19. Hsiao K., Scott M., Foster G. et al. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein // *Science*. — 1990. — 250, № 4987. — P. 1587-1590.
20. Jahn T., Radford S. The Yin and Yang of protein folding // *FEBS J.* — 2005. — 272, № 23. — P. 5962-5970.
21. Kisilevsky R., Lemieux L., Boudreau L. et al. New closes for amyloid enhancing factor (AEF): silk as AEF // *Amyloid*. — 1999. — 6, № 2. — P. 98-106.
22. Klunk W., Pettegrew J., Abraham D. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with beta-sheet conformation // *J. Histochem. Cytochem.* — 1989. — 37, № 8. — P. 1273-1281.
23. Koga T., Taguchi K., Kogiso M. et al. Amyloid formation of native folded protein induced by peptide-based graft copolymer // *FEBS Lett.* — 2002. — 531, № 2. — P. 137-140.
24. Krebs M., Wilkins D., Chung E. et al. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysocyme and a peptide fragment from the beta-domain // *J. Mol. Biol.* — 2000. — 300, № 3. — P. 541-549.
25. Kuczynski M. H. Weiter beitrage zur lehre von amyloid // *Klin. Wschr.* — 1923. — № 16. — S. 727-730.
26. Lee C.-C., Sun Y., Huang H. W. Membrane-mediated peptide conformation change from  $\alpha$ -monomers to  $\beta$ -aggregates // *Biophys. J.* — 2010. — 98, № 10. — P. 2236-2245.
27. Lindersson E., Beedholm R., Hojrup P. et al. Proteasomal inhibition by  $\alpha$ -synuclein filaments and oligomers // *J. Biol. Chem.* — 2004. — 279, № 13. — P. 12924-12934.

28. Ma J., Lindquist S. Conversion of PrP to a self-preparing PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in cytosol // *Science*. — 2002. — **298**, № 5599. — P. 1785-1788.
29. Meyer-Luehmann M., Coomaraswamy J., Bolmont T. Exogenous induction of cerebral  $\beta$ -amyloidogenesis is governed by agent and host // *Science*. — 2006. — **313**, № 5794. — P. 1781-1784.
30. Verevka, S. V. Formation and recognition of superficial microclusters as the integral part of processing of proteins // *Protein Research Progress: New Research*. — New York: Nova Science Publ., 2008. — P. 9-15.
31. Verevka S. V. Parametabolic  $\beta$ -Aggregation of proteins: familiar mechanisms with diverse sequels // *Advances in Medicine and Biology*. — New York: Nova Science Publ., 2013. — Vol. 72. — P. 29-48.
32. Verevka S. V., Grinenko T. V. Pseudo-functional interactions of plasminogen: molecular mechanisms and pathologic appearance // *Advances in Medicine and Biology*. — New York: Nova Science Publishers, 2011. — Vol. 34. — P. 35-62.
33. Sideras K., Gertz M. A. Amyloidosis // *Adv. Clin. Chem.* — 2009. — **47**. — P. 1-44.
34. Westermarck P., Benson M., Baxbaum J. et al. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis // *Amyloid*. — 2005. — **12**, № 1. — P. 1-4.
35. Zabolotnyi D. I., Gogunskaya I. V., Zabolotnaya D. D. et al. Suicide antigens: induced denaturation of proteins in the development of allergic reactions // *Advances in Medicine and Biology*. — New York: Nova Science Publ., 2012. — Vol. 53. — P. 217-232.
36. Zabolotny D. I., Verevka S. V. Inter-molecular coordination of proteins at normal and pathologic state // *Molecular Pathology of Proteins*. — New York: Nova Science Publishers, 2009. — P. 1-21.

Одержано 2.08.2014

## АУТОХТОННАЯ $\beta$ -АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ: ПРИЧИНЫ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Д. И. Заболотный, А. А. Белоусова, И. С. Зарицкая, С. В. Верёвка

Государственное учреждение “Институт отоларингологии  
им. проф. А. И. Колосийченко НАМН Украины”, 03680 Киев

Проанализированы данные последних лет, которые обусловили повышенный интерес в отношении так называемых мисфолдинговых заболеваний — патологий, обусловленных нарушением формирования структуры тех или иных белков. Среди подобных заболеваний особое место занимают процессы, связанные с формированием  $\beta$ -структурированных белковых агрегатов. Имеющиеся данные позволяют определить  $\beta$ -агрегацию белков *in vivo* как аутохтонный комплекс нарушений процессов молекулярного и клеточного уровней, развивающийся независимо от первопричины возникновения и существенно влияющий на течение физиологических процессов. Практически необратимый характер образования  $\beta$ -агрегатов, их способность к разрастанию за счет сорбции и структурной перестройки растворенных белков, стабильность, иммуногенность, устойчивость к протеолизу и способность к активации протеолитических процессов приводят к тяжелым нарушениям нормального функционирования организма. Достаточно универсальный характер механизмов запуска  $\beta$ -агрегации делает ее существенным патофизиологическим фактором, далеко выходящим за рамки классических представлений об амилоидогенных процессах и подлежащим обязательному учету при выяснении этиологии разнообразных осложнений, связанных с нарушением процессов обмена белка.

## AUTOCHTHONIC $\beta$ -AGGREGATION OF PROTEINS: CAUSES, MOLECULAR MECHANISMS, AND PATHOLOGICAL IMPLICATIONS

D. I. Zabolotnyi, A. A. Belousova, I. S. Zaritskaia, S. V. Verevka

State Institution “Prof A. I. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology NAMS Ukraine”, 03680 Kyiv

Analysed data of recent years which attracted special attention to the misfolding diseases, i. e. pathologies induced by a disturbance in the formation of certain proteins. Outstanding feature of these pathologies are the processes related to formation of  $\beta$ -stacked protein aggregates. Existing data allow to define  $\beta$ -aggregation of protein *in vivo* as autochthonic complex of disturbances on molecular and cellular levels that develops independently of prime cause and ranks over the latter significantly. Irreversible pattern of formation of  $\beta$ -aggregates, their capacity to outgrow through sorption and restructuring of dissolved proteins, stability, immunogenicity, resistance to proteolysis, and capacity to activate proteolytic processes lead to severe disorders in the organism function. Quite universal pattern of mechanisms triggering  $\beta$ -aggregation makes it a significant pathophysiological factor that grows out the classic ideas about amyloidogenic processes and subject to compulsory consideration of etiology of various complications related with disturbance of protein metabolism processes.