

*Д.И. ЗАБОЛОТНЫЙ, И.В. ГОГУНСКАЯ, Л.В. ЗАБРОДСКАЯ,
Д.Д. ЗАБОЛОТНАЯ, С.В. ВЕРЕВКА*

БИОГЕННЫЕ МИКРО- И НАНОЧАСТИЦЫ И ИХ АЛЛЕРГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ

*ГУ „Институт отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМНУ»,
дир. – чл.-кор. АМН Украины, проф. Д.И. Заболотный)*

В основе формирования аллергических реакций лежит способность иммунной системы организма распознавать чужеродные молекулы. Реакции формирования комплексов “антиген-антитело” отличаются высокой избирательностью и скоростью протекания, являясь одними из наиболее быстрых реакций межбелковых взаимодействий. При этом комплексообразование опосредовано формированием небольшой – порядка 1800 \AA^2 – зоной межмолекулярного контакта [6]. То есть распознаваемый и блокируемый антителом фрагмент на поверхности связываемого антигена соответствует группе из 2-3 компактно расположенных аминокислотных остатков [11]. Подобное – микрокластерное распознавание антителами функциональных партнеров резко упрощает выявление подлежащих связыванию чужеродных или денатурированных белков на фоне огромного множества своих нативных, сводя его к классическому распознаванию “своих” и “чужих”, когда “чужими” оказываются молекулы, имеющие поверхностную группировку, сформированную по отличным от принятых в данной биологической системе правилам [2]. Отсутствие подобного рода “черных меток” на поверхности своих белков обеспечивается фолдинговой системой данного организма, формирующей поверхность белковой молекулы в соответствии с теми же правилами. Денатурация, протеолиз, чрезмерное или недостаточное гликозилирование, равно как и любые причины, приводящие к возникновению неправильного поверхностного микрокластера, гарантированно обеспечивают идентификацию молекулы как чужеродной, подлежащей связыванию и удале-

нию соответствующими системами организма. При этом огромное значение имеет степень стабилизации распознаваемой структуры. Как известно, белки, будучи высокодинамичными молекулярными объектами, пребывают в состоянии динамического равновесия между более или менее стабилизированными конформационными состояниями [1]. Любые факторы, способствующие стабилизации на поверхности белка “чужой” группировки, приводят к возрастанию иммуногенности. В частности, один из классических путей повышения иммуногенности состоит в конъюгации белков с теми или иными молекулярными матрицами. Подобный методический подход широко применяется как в экспериментальной иммунологии, так и в биотехнологии и медицине. Адьювантные эффекты широко используются при изготовлении самых разнообразных антисывороток и вакцин.

Сравнительный анализ многочисленных аллергенов белковой природы свидетельствует о широком структурно-функциональном разнообразии последних при отсутствии каких-либо общих признаков, объясняющих их высокую иммунореактивность [5]. Однако при этом упускается из виду, что в условиях реального воздействия на организм эти белковые молекулы сорбированы на поверхности тех или иных микрочастиц, что существенно меняет их свойства и приводит к формированию комплекса свойств, обеспечивающих высокую иммуногенность.

Как известно, существенные отличия физико-химических свойств малоразмерных, обычно измеряемых в нанометрах, ча-

стиц составляют огромную, получившую интенсивное развитие в последнее десятилетие область знаний, называемых нанонаукой [3]. В первую очередь, необходимо подчеркнуть естественные ограничения инструментальных методов в отношении самой возможности выявления микро- и наночастиц. Согласно уравнению Аббе, существование дифракционной границы ставит в рамки возможность контрастного рассмотрения объекта в $0,604$ длины световой волны. Волны же светового диапазона имеют от 400 до 800 нанометров. При этом качество оптики никакой роли не играет, поскольку речь идет об ограничении, обусловленном волновой природой света. Неучет этого обстоятельства привел к описанию неисчислимого множества артефактов и породил термин “паразитного увеличения”. В то же время неспособность оптических методов зарегистрировать наночастицы вовсе не тождественна их отсутствию или неспособности принимать участие в тех или иных взаимодействиях. Более того – уменьшение частиц приводит к резкому увеличению удельной поверхности одной и той же массы вещества. Как известно, объем, а значит, и масса тела находятся в кубической зависимости от линейных размеров, тогда как площадь поверхности – в квадратической. Вследствие этого дробление тела приводит к увеличению суммарной экспонированной поверхности. В простейшем случае сферического тела его объем составляет $\frac{4}{3}\pi R^3$, а площадь поверхности – $4\pi R^2$. Поэтому перераспределение массы сферического тела диаметром, к примеру, 1 мм на сферы диаметром 1 мкм приводит к формированию миллиарда сфер с общей площадью поверхности свыше 30 см². Подобное увеличение экспонированной поверхности исходной массы равносильно соответствующему повышению вязкости окружающей среды, что, в частности, обуславливает способность микрочастиц к продолжительному парению в воздухе вплоть до формирования неоседающих аэрозолей. Стоит еще раз подчеркнуть, что 1 мкм – далеко не предел дробления микро- и наночастиц растительного, животного и инсектного происхождения, а по самым скромным подсчетам – через дыхательные органы че-

ловека в течение суток проходит не менее 10 кубометров воздуха.

Увеличение контактной поверхности приводит к резкому возрастанию роли мономолекулярных поверхностных процессов, ничтожно малых для тел обычных размеров, однако играющих существенную роль в наномире. На границе раздела фаз «твердое тело – жидкость» поверхность твердой фазы оказывается представленной широким набором в той или иной степени реактивно-способных групп, экспонированных в поверхностных концентрациях, на порядки превосходящих величины, достижимые в растворе. Тем самым на уровне поверхностного слоя создаются предпосылки для интенсивного протекания химических реакций с подвижными молекулярными составляющими жидкой фазы. Происходящие при этом процессы существенно отличаются от известных из курса общей химии. Так, взаимодействие белкового раствора с поверхностью такого, казалось бы, инертного материала, как золото, приводит к формированию мономолекулярного слоя ковалентно конъюгированного белка [14]. Образование дополнительных ковалентных связей обуславливает денатурацию связанной с поверхностью белковой молекулы, оказывающейся, в свою очередь, способной к ассоциативной денатурации последующих. Обусловленная плотным стерическим контактом высокая локальная плотность отдельных реактивно-способных групп позволяет говорить об особом, предферментативном, характере протекающих при этом внутри- и межмолекулярных реакций.

Молекулярные превращения, претерпеваемые белковыми молекулами в условиях плотного межмолекулярного контакта, наиболее подробно изучены на примере молекулярных самоповреждений белковых препаратов [4]. В силу высокой подвижности структуры белки весьма чувствительны к любым изменениям условий молекулярного окружения. Происходящие при этом изменения конформации принято делить на обратимые и необратимые. Если в первом случае перевод белка в условия, соответствующие нативным, приводит к восстановлению активной конформации, то во втором инактивация носит необратимый характер.

Однако даже обратимая денатурация при определенных условиях может трансформироваться в необратимую, опосредованную формированием новых внутри- и межмолекулярных ковалентных связей. Независимо от уровня иммуногенности исходной нативной формы белка присутствие во вводимом в организм препарате примеси изоформ, так или иначе денатурированных вследствие образования новых внутри- и межмолекулярных связей, неизбежно вызовет соответствующую реакцию иммунной системы. К наиболее изученным путям формирования новых внутри- и межбелковых связей относятся:

- реакции тиол-дисульфидного обмена, обусловленные способностью присутствующих в белке свободных SH-групп к обменно-взаимодействию с дисульфидными связями. При отсутствии свободных тиолов ковалентная агрегация может происходить вследствие β -элиминирования с асимметрическим расщеплением исходной дисульфидной связи и последующим образованием дегидроаланина и тиоцистеина. Дегидроаланин может взаимодействовать с ϵ -аминогруппой лизина, образуя ковалентную связь, тиоцистеин же расщепляется с образованием SH-групп, способных к тиол-дисульфидному обмену;

- реакции переамидирования, обусловленные способностью остатков аспарагина или глутамина взаимодействовать с ϵ -аминогруппами лизина или N-концевыми аминогруппами других белков. Условия плотного межмолекулярного контакта делают возможными и другие варианты амидного обмена;

- реакции конденсации остатков лизина и аргинина с соединениями, содержащими альдегидные и кетонные группы. Подобного рода реакции проходят через обратимую стадию образования высокореактивных оснований Шиффа с последующими внутримолекулярными трансформациями образовавшегося аддукта. Наиболее известный вариант подобного рода превращений – реакции неферментативного гликозилирования белков, сопровождающие целый ряд патологий и ведущие к разнообразным нарушениям нормального функционирования организма вследствие функционально не-

обоснованных изменений структуры соответствующих белков. Структура образующихся при этом производных существенно отлична от исходной, нативной, что приводит к целому ряду тяжелых функциональных последствий [15];

- особую группу реакций составляет индуцируемая денатурация белков, обусловленная присутствием регулярной гидрофобной поверхности. В условиях *in vitro* многие растворенные белки в присутствии β -структурированной матрицы формируют алмилоидоподобные агрегаты, причем ассоциированные молекулы также перестраиваются в β -структуры, поддерживая тем самым процесс послойной агрегации. Некоторые же белки агрегируют в растворе спонтанно [9].

Рассмотренные реакции далеко не исчерпывают возможности взаимодействия растворенных белков с поверхностным слоем твердого тела, однако и приведенные примеры позволяют приблизиться к пониманию процессов, происходящих на поверхности микро- и наночастиц респираторных аллергенов самого разнообразного, в первую очередь – биогенного происхождения. Бактериальная деградация и окисление биологического материала не только вызывают измельчение и развитие поверхности микрочастиц, но и обеспечивает формирование новых химически активных групп. Обусловленная ковалентными связями стабилизация денатурированной структуры конъюгированного белка, его высокая поверхностная концентрация и способность микро- и наночастиц к инкорпорации в клеточные структуры приводит к образованию уникального надмолекулярного комплекса с высокими иммуногенными характеристиками. В этом отношении наиболее показательны микро- и наночастицы биогенного происхождения. Обширная группа аллергий обусловлена таким, казалось бы, гидрофильным и инертным веществом, как хитин (β -(1-4)-поли-N-ацетил D-глюкозамин) [10]. Подобно многим структурным углеводам, структура хитина линейна и кристаллична, что одновременно способствует послойному дроблению и обеспечивает микрочастицам высокую механическую прочность и устойчивость к воздействию самых разно-

образных факторов внешней среды. В то же время поверхностный слой хитиновых микро- и наночастиц оказывается чуть ли не идеальным компонентом для осуществления реакций переамидирования с сорбированными белковыми молекулами. Обусловленная компактным расположением высокая поверхностная концентрация амидных групп способствует протеканию реакций, в обычных условиях не идущих или идущих крайне медленно. Вследствие этого формируется мономолекулярный поверхностный слой ковалентно конъюгированного денатурированного белка. Возможная последующая послойная агрегация белковых молекул не играет какой-либо роли, поскольку в любом случае наружная поверхность оказывается сформированной высокостабилизированным слоем денатурированного белка. При этом исходное происхождение формирующего поверхностный слой белка никакого значения не имеет. Вследствие контакта дыхательных путей с содержащим хитиновую пыль аэрозолем иммуногенный поверхностный монослой может формироваться в результате конъюгации собственного белка хозяина. С другой стороны, наноразмерность частиц, покрытых слоем денатурированного белка, является фактором, способствующим прохождению сквозь клеточные структуры. Иммунологические последствия такого свойства не поддаются даже приблизительной оценке, особенно при учете сложности путей элиминации подобного – супрамолекулярного объекта.

Не меньшего внимания заслуживают структурные особенности микро- и наночастиц растительных аллергенов, в первую очередь, пыльцы цветущих растений и ее фрагментов. Ничтожно медленное в условиях макромира окисление целлюлозы на поверхности микро- и наночастиц обеспечивает формирование поверхностного слоя, содержащего разнообразные, в первую очередь, альдегидные, группы, способные к интенсивному связыванию с белками. При контакте подобного рода частиц с находящимися в растворенном состоянии белками формируется иммуногенный слой денатурированного белка с развитием каскада реакций, характерных для аллергенов растительного происхождения.

Нельзя не упомянуть и о возможностях, обусловленных наличием восковых вкраплений, в изобилии представленных на поверхности как хитинового покрова, так и растительных аллергенов. Как известно, воск растительного и инсектного происхождения представляют собой сложные эфиры насыщенных жирных кислот с высокомолекулярными одноатомными спиртами. Способность подобного рода соединений ацилировать аминогруппы в растворе общеизвестна. С другой стороны, в составе плотной массы твердый воск отличается химической инертностью. Условия взаимодействия развитой поверхности микро- и наночастиц с находящимися в растворе белками являются во многом более подобными взаимодействиям в растворе. Тем самым создается возможность дополнительной денатурации вступившего в контакт поверхностью микро- и наночастиц растворенного белка, обусловленной абсолютно нефизиологическими реакциями ацилирования размещенных на поверхности белковой глобулы гидрофильных аминокислотных остатков. Однако даже и без учета возможных химических реакций наличие значительных (по молекулярным меркам) гидрофобных поверхностей способно индуцировать контактную денатурацию растворенного белка с последующим образованием ковалентных связей между находящимися в плотном контакте молекулами [4].

Не менее показательна респираторная и контактная аллергия, связанная с домашними животными, и, в первую очередь, с кошками. Считается, что основным кошачьим аллергеном является специфический белок Fel d1, вызывающий выраженный аллергический эффект у большинства лиц, имеющих аллергию на кошек [7, 12]. Подобно множеству белковых аллергенов, этот белок не обладает какими-либо структурно-функциональными свойствами, позволяющими предположить его высокую аллергенность. Однако при этом упускается из виду возможная роль микрочастиц шерсти, вернее, составляющего их основу α -кератина – белка, отличающегося высоким содержанием остатков цистеина и в наносоветиях идеально подходящего для дисульфидного обмена, к примеру, с тремя ди-

сульфидными связями, имеющимися в каждой из двух субъединиц наносимого со слюной на шерсть белка Fel d1 [13]. По всей видимости, формирование аллергической реакции на белок Fel d1 обеспечивается жестко стабилизированными молекулами белка, ковалентно конъюгированными на поверхности респираторных микрочастиц кошачьей шерсти, обуславливающих адьювантные эффекты при формировании соответствующей реакции у 60-90% лиц, имеющих аллергию на кошек [8]. Однако и без участия этого белка микро- и наночастицы кошачьей шерсти остаются эффективными аллергенами. Весьма вероятно, что именно ими обусловлено развитие астмы у самих кошек [13]. По всей видимости, профессиональная контактная и ингаляционная аллергия, связанная с шелкопрядным производством и складскими помещениями, также обусловлена аллергенными и аутоаллергенными эффектами микро- и наночастицами α -кератина. Подобно хитиновым и целлюлозным микрочастицам, речь идет о высокоструктурированном материале, достаточно устойчивом к воздействию факторов окружающей среды и имеющем химически активные группировки на поверхности. Шерсть животных также является чистым и стабильным химическим веществом. Она тоже подвержена разнообразным реакциям бактериальной и химической деградации, ведущим к формированию на поверхности новых активных групп, в ней содержатся разнообразные биогенные вещества. Эта шерсть также содержит вкрапления других веществ, в частности, пигментов, роль которых в формировании аллергических реак-

ций остается неизученной. Однако известна прямая зависимость аллергенности кошек от их масти: животные светлой окраски менее аллергенны, чем темные.

Изложенные материалы позволяют сделать вывод о существовании множественных путей формирования на поверхности микро- и наночастиц биогенного происхождения слоя денатурированного белка, ведущего в условиях организма к развитию специфических аутоаллергенных реакций. При этом основным аллергеном оказывается собственный белок, подвергшийся денатурационной конъюгации на поверхности соответствующих микро- и наночастиц биогенного происхождения. Ни собственная иммуногенность поверхностного слоя частиц, ни природа белка особой роли не играют, поскольку высокая поверхностная концентрация реактивноспособных групп статистически гарантирует формирование иммуногенного слоя денатурированного белка. По всей видимости, сравнение особенностей молекулярных компонентов структуры и размерности, а также физико-химических свойств биогенных аллергенов может пролить свет на природу перекрестной аллергенности как следствия подобия денатурационных превращений вступающих с ними в контакт белков. Естественно, что пути формирования обусловленных микро- и наночастицами аллергенных и аутоаллергенных реакций далеко не исчерпываются рассмотренными в данной работе примерами хитина, целлюлозы и α -кератина, как не ограничиваются они и биогенным происхождением респираторных наноразмерных аллергенов.

1. Демченко А.П. Люминисценция и динамика структуры белков. – К.: Наукова думка, 1988. – 280 с.
2. Заболотный Д.И., Веревка С.В. Межмолекулярная координация белков в норме и при патологии / в кн.: Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И. Заболотного. – Киев: «Логос», 2008. – С.9-31.
3. Коллоидно-химические основы наноауки. Под ред. А.П. Шпака и З.Р. Ульберг. – Киев: Академперіодика, 2005, 466 с.
4. Шевель М.В., Веревка С.В. Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути предотвращения // Совр. пробл. токсикол. – 2006. – №3. – С. 41-45.

5. Aalberse R.C. Structural biology of allergens // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – 106, N 2. – P.228-238.
6. Janin J. Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics // *Biochimie.* – 1995. – 77, N 7/8. – P. 497-503.
7. Kaiser L., Gronlund H., Sandalova T., Ljunggren H-G., von Hage-Hamsten M., Achour A., Schneider G. The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of secretoglobulin family // *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278, N 39. – P.37730-37735.
8. Kleine-Tebbe J., Kleine-Tebbe A., Jeep S., Schou C., Lowenstein H., Kunkel G. Role of the main allergen (Fel d 1) in patients sensitized to cat allergens // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1993. – 100, N 3. – P.256-262.
9. Koga T., Taguchi K., Kogiso M., et al. Amyloid formation of native folded protein induced by peptide-based graft copolymer // *FEBS Lett.* – 2002. – 531, N 2. – P.137-140.
10. Lee C.G. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling // *Yonsei Med. J.* – 2009. – 50, N 1. – P.22-30.
11. Lo Conte L., Chothia C., Janin J. Atomic structure of protein-protein recognition site // *J. Mol. Biol.* – 1999. – 285, N 5. – P.2177-2198.
12. van Ree R., van Leeuwen W.A., Bulder I., Bond J., Aalberse R.C. Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in vitro diagnostics for cat allergy // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1999. – 104, N 6. – P.1223-1230.
13. Reiner C.R., De Clue A.E., Rabinowitz P. Asthma in humans and cats: is there a common sensitivity to aeroallergens in shared environment // *Environment Research.* – 2009.
14. Snopok B.A., Kostyukevich K.V., Beketov G.V., Zinio S.A., Shirshov Yu.M., Venger E.F., Verevka S.V. Biochemical passivation of metal surfaces for sensor application: reactive annealing of polycrystalline gold films in hydrogen sulfide atmosphere // *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics.* – 2000. – 3, N 1. – P.59-68.
15. Swergold B.S., Howell S.K., Beisswenger P.J. Nonenzymatic glycation / enzymatic deglycation: a novel hypothesis on the etiology of diabetic complications // *International Congress Series* 1245. – 2002. – P.143-152.

Поступила в редакцію 29.05.09.

© Д.И. Заболотный, И.В. Гогунская, Л.В. Забродская, С.В. Вереvка, 2009

БІОГЕННІ МІКРО- І НАНОЧАСТИНКИ ТА ЇХ АЛЕРГЕННА ДІЯ

*Заболотний Д.И., Гогунська І.В., Забродська Л.В.,
Заболотна Д.Д., Вереvка С.В. (Київ)*

Резюме

Порівняння хімічної структури різноманітних алергенів свідчить про відсутність будь-яких спільних особливостей, що зумовлюють виражений фізіологічний ефект. При цьому, однак, лишаються поза увагою реальні умови впливу алергенів на організм. При дослідженні білків не враховується їх денатурація на шляху до дихальних органів. Не може бути проігнорована й роль поверхневого рівня дрібнодисперсних частинок, що є носіями відповідних молекул. Співвідношення даних імунології, білкової хімії та нанонауки дозволяє обґрунтувати положення про якісно нову – аутоалергенну дію різноманітних нано- та мікрочастинок, зумовлену формуванням денатурованого шару власного білка хазяїна на поверхні мікрочастинок. Розглядаються фізико-хімічні процеси формування поверхневого білкового шару, функціональні наслідки його утворення.

BIOGENIC MICRO- AND NANO-PARTICLES AND THEIR ALLERGIC ACTION

*Zabolotnyi D.I., Gogunskaya I.V., Zabrodska L.V.,
Zabolotna D.D., Verevka S.V. (Kyev)*

Summary

The different allergens possess a wonderful feature, they do not have any common structural and functional prerequisites, which predetermine their highly expressed physiological action. However, we should not overlook the real conditions for the display of corresponding effects. We have notify the role of denaturation of the proteins on their way to human respiratory tract. The role of the surface layer of micro-particles, which are the carriers of the correspondent molecules, can't be ignored, too. The combined data of immunology, protein chemistry, and nanoscience let us to base the statement concerning qualitatively new, autoallergic action of the different nano- and micro-particles, which is conditioned by the formation of the denaturated layer of the own proteins on the micro-particle surface. In this chapter the physico-chemical processes of the protein surface formation and functional consequences of its formation have been considered.